

Salmonellose der Maus

**Untersuchungen zur Rolle der Makrophagen
als Effektorzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg i.Br.

vorgelegt von
Erich Blumenstock
aus Wallhausen

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Salmonellose der Maus

Untersuchungen zur Rolle der Makrophagen als Effektorzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg i.Br.



vorgelegt von
Erich Blumenstock
aus Wallhausen

1979

Dekan	: Prof. Dr. K. Hahlbrock
Leiter der Arbeit	: Prof. Dr. K. Jann
Referent	: Prof. Dr. O. Westphal
Korreferent	: Prof. Dr. G. Drews

Tag der Verkündigung des Prüfungsergebnisses : 15.6.1979



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Blumenstock, E. und Jann, K.: Interaction of Salmonella typhimurium with murine macrophages - an animal infection model.

Third International Symposium about Biologically Active Products of Micro-organisms in Pathogenesis of Human Diseases, Prag-Liblice, September 1978.

Herrn Prof. Dr. K. Jann möchte ich meinen besonderen Dank für die stete Hilfsbereitschaft und zahlreichen anregenden Diskussionen aussprechen. Dieser Dank gilt auch Frau Dr. B. Jann.

Herrn Prof. Dr. H. Fischer bin ich für die Ermöglichung der Chemilumineszenz-Messungen zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. G. Schmidt und Frl. U. Fischer danke ich für die Bereitstellung der Bakterien.

Frau Dr. M.-L. Lohmann-Matthes bin ich für die Überlassung der Knochenmarkmakrophagen dankbar.

Frl. C. Heidkämper und Frl. M. Held danke ich sehr für die gewährte technische Hilfe, Frau Strohm und Frau L. Lay für die photographischen Arbeiten, sowie Frau R. Schneider für die Herstellung der Druckvorlage.

Bei allen Kollegen und Mitarbeitern, insbesondere den Herren Dr. N.L. v. Jeney, Dr. H. Taskov und T. Tomita und Frl. I. Moser, bedanke ich mich für Hilfsbereitschaft, Ratschläge und gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. O. Westphal danke ich für die Ermöglichung einer finanziellen Unterstützung durch die VW-Stiftung.

Mein Dank geht auch an die Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. für die Gewährung des Promotions-Stipendiums.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

	Seite
I. Einleitung	1
1. Abwehrmechanismen gegen bakterielle Infektionen	1
1.1. Unspezifische Abwehrmechanismen	1
1.2. Spezifische Immunabwehr	4
2. Salmonellen als Krankheitserreger	7
3. Salmonellose der Maus als Modellinfektion	8
3.1. Virulenzfaktoren bei Salmonellen	8
3.2. Abwehrmechanismen bei Mäusetyphus	10
4. Problemstellung und Ziel der Arbeit	12
 II. Untersuchungen und Ergebnisse	 14
1. Entwicklung und Charakterisierung eines Systems der in vitro Abtötung von <u>S.typhimurium</u> durch Peritonealmakrophagen der Maus	14
1.1. Untersuchungen mit normalen Makrophagen	14
1.1.1. Nachweis der Abtötung von S.typhimurium durch normale Makrophagen	15
1.1.2. Abhängigkeit der Abtötung von <u>S.typhimurium</u> durch Makrophagen von der Bakterienkonzentration	16
1.2. Untersuchungen mit aktivierten Makrophagen	19
1.2.1. Bakterizide Aktivität von Makrophagen aus <u>S.typhimurium</u> SF10223-infizierten C3Hf-Mäusen in Abhängigkeit des Infek- tionsverlaufs	19
1.2.2. Verwendung eines E.coli-S.typhimurium-Hybrids zur Gewinnung aktivierter Makrophagen aus C3Hf-Mäusen	23
1.3. Charakterisierung der bakteriziden Aktivität normaler und aktivierter Makrophagen	25
1.3.1. Einfluß der Kultivierungsdauer von Makrophagen und der Vorinkubation mit Antibiotika	25

1.3.2. Abtötungskinetik normaler und aktivierter Makrophagen	28
1.3.3. Einfluß der Opsonisierung von <u>S.typhimurium</u> auf die Interaktion mit normalen und aktivierten Makrophagen	30
2. Abtötung von <u>S.typhimurium</u> SF10223 und SF1826 durch Makrophagen von C3Hf- und C57Bl/6-Mäusen	32
2.1. Vergleich der bakteriziden Kapazität normaler Makrophagen	33
2.2. Versuche zur Gewinnung aktivierter Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen	37
2.2.1. Vergleich der Immunisierung von C57Bl/6- und C3Hf-Mäusen mit dem <u>E.coli-S.typhimurium</u> -Hybrid F1142	38
2.2.2. Bakterizide Aktivität von Makrophagen aus <u>S.typhimurium</u> SF10223-infizierten C57Bl/6-Mäusen in Abhängigkeit des Infektionsverlaufs	42
2.3. Vergleich der bakteriziden Kapazität aktivierter Makrophagen	44
2.4. Über die Verwendung von Knochenmarkmakrophagen zur Abtötung von <u>S.typhimurium</u>	45
3. Versuche zur Lokalisierung der Abtötung von <u>S.typhimurium</u> durch Peritonealmakrophagen	48
3.1. Untersuchung der Überstände von Makrophagenkulturen auf bakterizide Aktivität	48
3.2. Einfluß von Cytochalasin B und 2-Desoxy-D-glukose auf die Abtötung von Bakterien durch Makrophagen	51
3.3. Bakterizide Aktivität der Makrophagen in Abhängigkeit von der Cytochalasin B-Zugabe und der Opsonisierung der Bakterien	52
4. Versuche zur Abtötung radioaktiv markierter Bakterien durch normale Peritonealmakrophagen	55
4.1. Einfluß der Opsonisierung mit Antiserum auf die Assoziation und Abtötung radioaktiv markierter Bakterien durch Makrophagen	55
4.2. Einfluß von Cytochalasin B auf die Abtötung von radioaktiv markierten <u>S.typhimurium</u> durch Makrophagen	59
5. Bakterizide Aktivität eines Xanthinoxidase-Systems gegen <u>S.typhimurium</u>	61
6. Biochemische Untersuchungen zu möglichen Virulenzfaktoren von <u>S.typhimurium</u>	65
6.1. Bestimmung der Superoxid-Dismutase-Aktivität der Bakterien	66

6.2. Proteinzusammensetzung der äußeren Membran von <u>S.typhimurium</u>	68
7. Chemilumineszenz bei der Interaktion von Peritonealmakrophagen mit <u>S.typhimurium</u>	70
7.1. Nachweis der Chemilumineszenz	71
7.1.1. Chemilumineszenz mit normalen Makrophagen	71
7.1.2. Chemilumineszenz mit aktivierten Makrophagen	75
7.2. Untersuchungen zur Korrelation von Chemilumineszenz und bakterizider Aktivität der Makrophagen	77
7.2.1. Vergleich der Chemilumineszenz-Respons von normalen Makrophagen aus infektresistenten C3Hf- und infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen auf virulente und avirulente <u>S.typhimurium</u>	77
7.2.2. Vergleich der Chemilumineszenz-Respons auf <u>S.typhimurium</u> SF1826 und <u>E.coli</u> F492	79
7.2.3. Einfluß freier Bakterien auf die Chemilumineszenz-Kinetik	80
7.2.4. Einfluß von 2-Desoxy-D-glukose auf die Chemilumineszenz	83
7.2.5. Einfluß von Cytochalasin B auf die Chemilumineszenz	85
7.3. Einfluß der Opsonisierung der Bakterien auf die Chemilumineszenz der Makrophagen	87
7.4. Chemilumineszenz als Kriterium der Makrophagenaktivierung	90
7.5. Chemilumineszenz-Untersuchungen mit toten Bakterien	93
III. Diskussion	96
1. Rolle der Makrophagen in der natürlichen Resistenz und der erworbenen Immunität	96
2. Untersuchungen zur bakteriziden Aktivität der Makrophagen	98
IV. Zusammenfassung	102
V. Material und Methoden	105
1. Kulturmedien und Puffer	105
1.1. Bakteriologische Nährmedien	105
1.2. Zellkulturmedien	106
1.3. Puffer	106
2. Bakterien	106

2.1. Bakterienstämme	106
2.2. Stammhaltung	107
2.3. Züchtung der Bakterien	107
2.4. ³ H-Thymidinmarkierung von Bakterien	107
2.5. UV-getötete Bakterien	108
2.6. Hitzegetötete Bakterien	108
2.7. Opsonisierung von Bakterien	108
3. Versuchstiere	109
3.1. Mäusestämme	109
3.2. Infektion der Mäuse	109
4. Seren	109
4.1. Komplementserum	109
4.1.1. Gewinnung	109
4.1.2. Absorption mit Bakterien	110
4.1.3. Inaktivierung	110
4.2. Antiseren	110
4.2.1. Gewinnung	110
4.2.2. Titerbestimmung durch Bakterienagglutination	111
4.2.3. Bestimmung des Dithiotreitol-resistenten Titers	111
5. Infektions- und Immunisierungsversuche	111
5.1. Bestimmung der letalen Infektionsdosis	111
5.2. Keimzahlverlauf in infizierten Tieren	112
5.2.1. Quantitative Bestimmung lebender Bakterien im Peritoneum	112
5.2.2. Quantitative Bestimmung lebender Bakterien in der Milz	112
5.3. Immunisierungsversuche	112
5.3.1. Infektionsbelastung der Mäuse nach Immunisierung	113
6. Gewinnung von Peritonealzellen	113
6.1. Normale Mäuse	113
6.2. Infizierte Mäuse	113
6.3. Mit Thioglykollat-Medium behandelte Mäuse	113
7. <u>In vitro</u> Untersuchungen mit Makrophagen	114
7.1. Bindung und Abtötung nicht radioaktiv markierter Bakterien durch Makrophagen	114
7.1.1. Kulturbedingungen der Makrophagen	114
7.1.1.1. Peritonealmakrophagen	114

7.1.1.2. Knochenmarkmakrophagen	114
7.1.2. Bestimmung der Menge adh�rierender Peritonealmakrophagen	115
7.1.2.1. Giemsa-Färbung	115
7.1.2.2. Ablösen haftender normaler Makrophagen	115
7.1.2.3. Proteinbestimmung der haftenden Zellen	116
7.1.3. Bindung und Abtötung der Bakterien durch Makrophagen	116
7.1.3.1. Behandlung der Makrophagen mit Cytochalasin B	117
7.1.3.2. Behandlung der Makrophagen mit 2-Desoxy-D-glukose	117
7.2. Test auf bakterizide Aktivität in Überständen von ruhenden und phagozytierenden Makrophagen	117
7.3. Bindung und Abtötung von radioaktiv markierten Bakterien durch Peritonealmakrophagen	118
7.4. Chemilumineszenz	119
7.4.1. Kulturbedingungen der Makrophagen	119
7.4.2. Herstellung einer Luminol-gesättigten Lösung in FCS	119
7.4.3. Messung der Chemilumineszenz-Respons auf Bakterien	119
7.4.3.1. Behandlung der Makrophagen mit Cytochalasin B	120
7.4.3.2. Behandlung der Makrophagen mit 2-Desoxy-D-glukose	120
7.4.3.3. Behandlung der Makrophagen mit Ultraschall und NADH oder NADPH	121
7.4.3.4. Messung der Chemilumineszenz-Respons nach Entfernung freier Bakterien	121
8. Einwirkung eines Xanthinoxidase-Systems und von Lysozym auf <u>S.typhimurium</u>	121
8.1. Reaktionsansatz des Xanthinoxidase-Systems	121
8.2. Testbedingungen	122
9. Biochemische Untersuchungen an <u>S.typhimurium</u>	122
9.1. Bestimmung der Superoxid-Dismutase-Aktivität	122
9.1.1. Zellaufschluß mit der French-Presse	122
9.1.2. Fraktionierung des Zellhomogenats	123
9.1.3. Zellaufschluß durch EDTA- und Lysozymbehandlung	123
9.1.4. Aktivitätsbestimmung	123
9.2. Bestimmung des Proteinmusters der äußeren Membran	124
9.2.1. Isolierung der äußeren Membranfraktion	124
9.2.1.1. Züchtungsbedingungen	124
9.2.1.2. Sphäroplastierung	124
9.2.1.3. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation	125

9.2.2. Trennung der Membranproteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	126
9.2.2.1. Herstellung der Gele	126
9.2.2.2. Desintegration der Membranpräparation	127
9.2.2.3. Bedingungen für die Elektrophorese	127
9.2.3. Färbung der Gele	128
VI. Literaturverzeichnis	129

Abkürzungen

A	Absorption
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonukleinsäure spaltendes Enzym
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
Hepes	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
i.p.	intraperitoneal
LD ₅₀	Dosis die bei 50% der Versuchstiere zum Tod führt
MCF	Makrophagen-zytotoxischer Faktor
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid, reduziert
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RNase	Ribonukleinsäure spaltendes Enzym
SA	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPF	spezifisch pathogenfrei
U	Enzymeinheit (unit)
UpM	Umdrehungen pro Minute

I. Einleitung

1. Abwehrmechanismen gegen bakterielle Infektionen

Alle höheren Lebewesen stehen in ständigem Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen. Zur Erregung einer Infektionskrankheit muß ein Pathogen die Fähigkeit zur Infektion besitzen, d.h. es muß in den Makroorganismus eindringen, sich dort behaupten und vermehren und den Wirt schädigen können. Mehrere Abwehrbarrieren verhindern aber in der Regel das Eindringen und die Ausbreitung möglicher Parasiten in das Gewebe.

1.1. Unspezifische Abwehrmechanismen

Haut und Schleimhäute dienen als mechanische Barrieren gegen eindringende Mikroorganismen und verfügen außerdem noch über bakterizide Sekrete wie Milchsäure und Fettsäuren im Schweiß und Talg, Lysozym in den Sekreten der Schleimhäute und die Magensäure.

Gelingt es Krankheitserregern diese Barriere zu überwinden und in den höheren Organismus einzudringen, so stehen ihnen dort, auch in Wirten, die mit dem betreffenden Keim noch nicht in Berührung kamen, wirksame Abwehrmechanismen entgegen. Das Komplementsystem im Blut und anderen serösen Flüssigkeiten und die phagozytierenden Zellen stellen wesentliche Komponenten dar, welche die unspezifische natürliche Resistenz vermitteln. Das Komplementsystem und die Phagozyten können getrennt aber auch kooperativ antibakteriell wirken.

Das Komplementsystem (siehe Abb. 1) besteht aus einer Serie von 9 Proteinkomponenten, die in einer Reaktionsfolge nach Art einer Kaskade reagieren und in den letzten Schritten Zellmembranen schädigen und zur Lyse von Bakterien führen können. Die klassische Aktivierung des Komplementsystems findet über einen Immunkomplex statt, während eine unspezifische Aktivierung über den Properdin-Nebenweg, z.B. durch das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien (2) oder durch hochpolymere Polysaccharide, wie z.B. Zymosan (3), ausgelöst werden kann. Neben dem direkten bakteriziden Effekt trägt die Komplementaktivierung auf weiteren Wegen noch

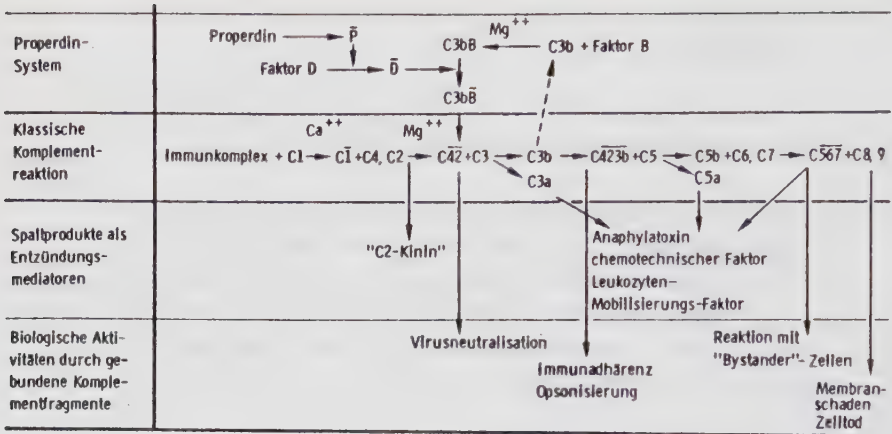


Abb. 1: Schema der Komplementreaktion (aus 1)

indirekt zur Bakterientötung bei. Während des Aktivierungsprozesses werden chemotaktische Fragmente (C3a und C5a) freigesetzt, die Phagozyten anlocken. An Bakterien gebundenes Komplement (C3b) wirkt zudem opsonisierend, d.h. es erhöht die Adhärenz der Bakterien an die eingewanderten Phagozyten. Die Aufnahme durch Phagozyten hat die Abtötung und Verdauung vieler pathogener Keime zur Folge. Fakultativ intrazelluläre Parasiten dagegen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, daß sie sich auch in Phagozyten vermehren können und infolgedessen häufig zu chronischen Erkrankungen, wie z.B. Tuberkulose, führen.

Die Bedeutung phagozytischer Zellen in der Infektabwehr wurde schon 1882 von Metschnikoff entdeckt, fand jedoch erst viel später allgemeine Anerkennung. Die Phagozyten werden in mononukleare Phagozyten, zu denen die Makrophagen gehören, und in polymorphnukleare Leukozyten (Granulozyten) eingeteilt (siehe Tab. 1). Beide Zelltypen gehen aus Stammzellen des Knochenmarks hervor.

In einer Reihe von Teilungs- und Differenzierungsschritten entstehen im Knochenmark die unreifen Promonozyten. Sie teilen sich zu Monozyten,

Zellen	Differenzierung	Anteil an Blutleukozyten	Lebensspanne	Chemotaxis ver- mittelt durch	Intrazelluläre Aktivität
mononukleare Phagozyten	im Blut und Gewebe	5%	Monate bis Jahre	Lymphokine aus T-Zellen	durch Lymphokine gesteigert
Granulozyten	ausgereifte Endzelle	50%	2 Tage	Komplement (C3a, C5a)	unveränderlich

Tab. 1: Eigenschaften von Phagozyten und Regulation einiger Funktionen

die in den Blutkreislauf abgegeben werden. Dort machen sie etwa 5% der zirkulierenden Zellen aus. Nach einer durchschnittlichen Verweildauer von einem Tag wandern die Zellen ins Gewebe aus, wobei sie sich zu Makrophagen differenzieren. Makrophagen kommen entweder ortsständig vor allem in Leber, Milz, Lymphknoten und Sinusbereichen des Blut- und Lymphgefäßsystems oder als wandernde Zellen vor. Die Gesamtheit der Makrophagen wird als das retikuloendotheliale System (RES) bezeichnet. Makrophagen besitzen eine Lebensdauer von mehreren Monaten. Ein wesentliches Merkmal der Makrophagen ist in ihrer Fähigkeit zu sehen, daß ihre bakterizide Aktivität gesteigert werden kann.

Die Entwicklung der Granulozyten wird bereits im Knochenmark abgeschlossen. Sie verlieren dabei ihre Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum. Im Gegensatz zu mononuklearen Phagozyten werden sie im Knochenmark auf Vorrat produziert. Bei Infektionen kann innerhalb weniger Stunden eine Ausschüttung zahlreicher Granulozyten in den Blutkreislauf erfolgen. Normalerweise stellen sie dort ca. 50% der Leukozyten dar. Nach einer mittleren Verweildauer von 6 bis 12 Stunden im Blut wandern auch sie ins Gewebe aus, leben aber dort nur noch ca. einen Tag.

In den kurzlebigen Granulozyten mit ihrem unveränderlichen Satz an bakteriziden Mechanismen ist die "Feuerwehr" unter den Phagozyten zu sehen, die zuerst in der Bekämpfung einer mikrobiellen Invasion eingesetzt wird und akute Infektionen in der Regel überwinden kann. Infektionen mit fakultativ intrazellulären Bakterien erfordern dagegen die gesteigerte bakterizide Kapazität der Makrophagen, um der Erkrankung Herr zu werden.

1.2. Spezifische Immunabwehr

Außer dem unspezifische Resistenz vermittelnden System kann der Organismus mit Hilfe des Immunsystems eine spezifische Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen entwickeln. Das Immunsystem besteht im wesentlichen aus den Lymphozyten, welche für die charakteristischen Eigenschaften und Reaktionen des Immunsystems verantwortlich sind (4). Dazu gehören die Fähigkeit zur spezifischen Erkennung eines Antigens und die Entstehung des immunologischen Gedächtnisses, das sich in einer schnelleren

und verstärkten Sekundärreaktion bei nochmaligem Kontakt mit dem Antigen ausdrückt.

Die Lymphozyten entstehen im erwachsenen Tier im Knochenmark aus undifferenzierten Stammzellen. Sie machen in den primären lymphatischen Organen, dem Thymus und dem Bursaäquivalent (unter Umständen darm-assoziiertes, lymphatisches Gewebe), eine Differenzierung und Reifung durch und erscheinen danach als immunkompetente, antigensensitive T- oder B-Lymphozyten im peripheren lymphatischen System. Dazu gehören Lymphknoten und Milz. Die T-Lymphozyten rezirkulieren auch durch die Blut- und Lymphbahn. Nach Kontakt mit dem passenden Antigen beginnen die Lymphozyten zu proliferieren und sich zu vergrößern, wonach dann einerseits die langlebigen kleinen antigensensitiven Gedächtnislymphozyten und andererseits die lymphatischen Effektorzellen hervorgehen.

B-Zellen differenzieren sich nach Antigenkontakt zu Plasmazellen und produzieren Antikörper. Die damit einhergehende humorale Immunität kann mit Serum übertragen werden und beinhaltet die verschiedenen Antigen-Antikörper-Reaktionen. Die Bindung von Antikörpern an Bakterien führt zu der sogenannten klassischen Komplementaktivierung, wie sie in Abb.1 dargestellt ist. Die Konsequenzen dieser Aktivierung sind die gleichen wie bei der Aktivierung über den Properdin-Nebenweg (komplementvermittelte Lyse, chemotaktisches Einwandern der Granulozyten und erhöhte Adhärenz an Phagozyten). Die Auslösung der Komplementaktivierung durch Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt aber unabhängig von Oberflächenstrukturen der Bakterien, so daß im Gegensatz zum Properdin-Nebenweg, alle Bakterien der Komplementwirkung ausgesetzt werden. Weiterhin haben antigengebundene Antikörper an sich einen opsonisierenden Effekt. Die Phagozytoseresistenz mancher bekapselter Bakterien, wie z.B. Diplococcus pneumoniae, wird sogar erst durch die Opsonisierung mit Antikörpern aufgehoben.

T-Zellen sind verantwortlich für die zellvermittelte Immunität. Diese Art der Immunität kann nur mit Zellen von Spender auf Empfänger übertragen werden. Die Effektormechanismen der zellvermittelten Immunität werden oft durch lösliche Mediatoren (Lymphokine) induziert, wie es z.B. für die Steigerung der bakteriziden Aktivität der Makrophagen bei einer Infektion mit Listeria monocytogenes, einem fakultativ intrazellulären Parasiten, nachgewiesen wurde (5,6,7).

Die spezifische Immunabwehr beruht also auf einer Verstärkung der bereits im normalen Tier vorhandenen unspezifischen Effektormechanismen, dem Komplementsystem und den Phagozyten. Es ist dabei nur die Auslösung der Abwehrmechanismen, die über eine spezifische Antigenerkennung erfolgt. Die Wechselwirkungen zwischen unspezifischen Effektormechanismen und spezifischen, immunologischen Reaktionen sind in Abb. 2 noch einmal zusammengefaßt.

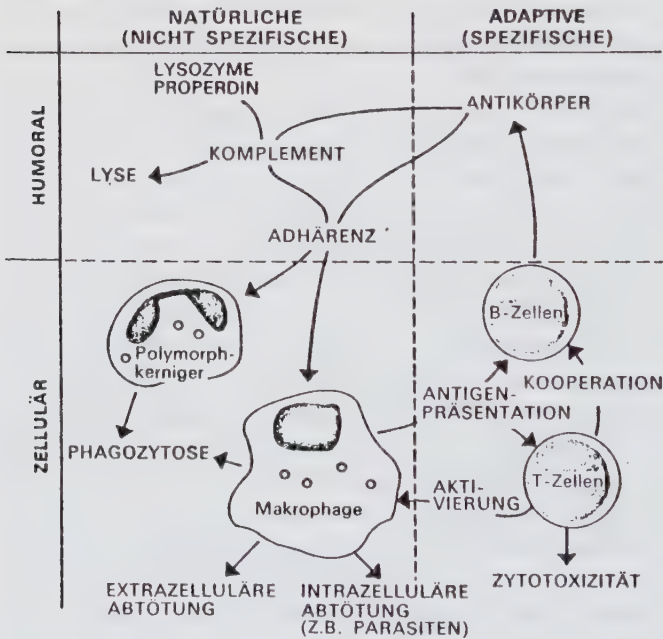


Abb. 2: Vereinfachtes Schema über die Wechselwirkung zwischen den Mechanismen der natürlichen, unspezifischen Infektabwehr und der spezifischen Immunität (aus 8).

2. Salmonellen als Krankheitserreger

Die Gattung Salmonella gehört zur Familie der Enterobacteriaceen und umfaßt etwa 1600 Arten (9). Sie können serologisch voneinander unterschieden werden und sind seit 1934 in dem Kauffmann-White-Schema zusammengefaßt und eingeteilt (10,11). Viele Salmonellen gelten als pathogen, entweder für den Menschen oder für Tiere und oft für beide (12).

Die Krankheitsbilder verschiedener Salmonellosen werden allgemein in 3 Typen eingeteilt (12). Der typhöse Krankheitstyp, z.B. Typhus abdominalis beim Menschen, verursacht durch Salmonella typhi, wird charakterisiert durch eine Inkubationszeit von 7 - 14 Tagen, gefolgt durch hohes Fieber, Bewußtseinsstörungen (griechisch: typhos = Nebel) und 2 - 3 Wochen lang anhaltende Abdominalschmerzen. Bakteriämie mit hauptsächlichlicher Infektion des Retikuloendothelialsystems ist die Regel. S.paratyphi A, B und C verursachen beim Menschen mildere Krankheitsbilder vom typhösen Typ (Paratyphus). Der septicaemische Krankheitstyp, bei Menschen oft verursacht durch S.cholerae-suis, ist dem typhösen Typ ähnlich: nach Fieberanfällen und Bakteriämie entstehen Abszesse in verschiedenen Organen. Beim gastro-enteritischen Krankheitsstyp, im Menschen oft hervorgerufen durch S.typhimurium und S.enteritidis, erscheinen nach einer Inkubationszeit von 8 - 48 Stunden Erbrechen und Diarrhöe, Fieber und Schüttelfrost. Die Bakterien vermehren sich im Darm und treten nicht ins Blut über.

Die Infektion durch Salmonellen findet in der Regel oral statt. Für typhöse Erkrankungen sind nur wenige Bakterien nötig; diese können daher sogar nur durch leicht kontaminiertes Trinkwasser übertragen werden. Bei gastro-enteritischen Erkrankungen sind größere Mengen nötig und die Infektion findet meist durch kontaminierte Nahrung statt (Lebensmittelvergiftung).

Als vorbeugende Maßnahmen zur Bekämpfung von Typhus beim Menschen werden aktive Immunisierungen mit abgetöteten Vakzinen durchgeführt, die injiziert oder oral appliziert werden. Impfeinbrüche werden jedoch immer wieder beobachtet, die auf einen unzureichenden Schutz schließen lassen (13,14).

Im Tierversuch wurde häufig mit attenuierten Lebendvakzinen, im Vergleich zu Totimpfstoffen, ein optimaler Schutz erzielt (15,16). Die

Anwendung attenuierter Keime in der humanen Typhusprophylaxe ist aber risikoreich, da die genetischen Hintergründe der Avirulenz noch weitgehend unverstanden sind und infolgedessen eine Reversion der Vakzinekeime zu virulenten Wildformen nicht auszuschließen ist. Voraussetzung für die Entwicklung einer zufriedenstellenden Typhusvakzine ist die Kenntnis der Virulenzfaktoren dieser Bakterien und der Mechanismen, die für eine erfolgreiche Infektabwehr erforderlich sind. Versuche, die dieses grundlegende Verständnis des Infektionsgeschehens und der Wirkungsweise einer erworbenen Immunität vermitteln, müssen zunächst an einem geeigneten Tiermodell durchgeführt werden.

3. Salmonellose der Maus als Modellinfektion

Es wurde festgestellt, daß die typhöse Infektion der Maus, verursacht durch S.typhimurium oder S.enteritidis, in ihrer Erscheinung dem typhösen Krankheitsbild des Menschen gleicht (17,18,19). Die Infektion wird daher vielfach als Modell für den Typhus abdominalis des Menschen verwendet, um die Ursachen der Virulenz der Bakterien und die Abwehrmechanismen des Wirts zu untersuchen.

3.1 Virulenzfaktoren bei Salmonellen

Da bei Salmonellen bisher keine Exotoxine nachgewiesen werden konnten, sind Oberflächenstrukturen, über welche die erste und möglicherweise entscheidende Berührung mit den Zellen des Wirts stattfindet, von besonderem Interesse für das Infektionsgeschehen und die Virulenz dieser Bakterien.

Kapseln werden durch Salmonellen im allgemeinen nicht gebildet. Eine Ausnahme bildet das Vi-Antigen, das bei S.typhi vorkommt und bei der humanen Infektion als Virulenzfaktor diskutiert wird (20).

Eine Beteiligung der Fimbrien und Flagellen im Infektionsprozeß konnte bisher nicht nachgewiesen werden (21,22).

Die Rolle des Lipopolysaccharids (LPS) als Virulenzfaktor wurde intensiv untersucht. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Membran gram-nega-

tiver Bakterien (23). In Abb. 3 ist ein LPS-Molekül aus S.typhimurium schematisch dargestellt.

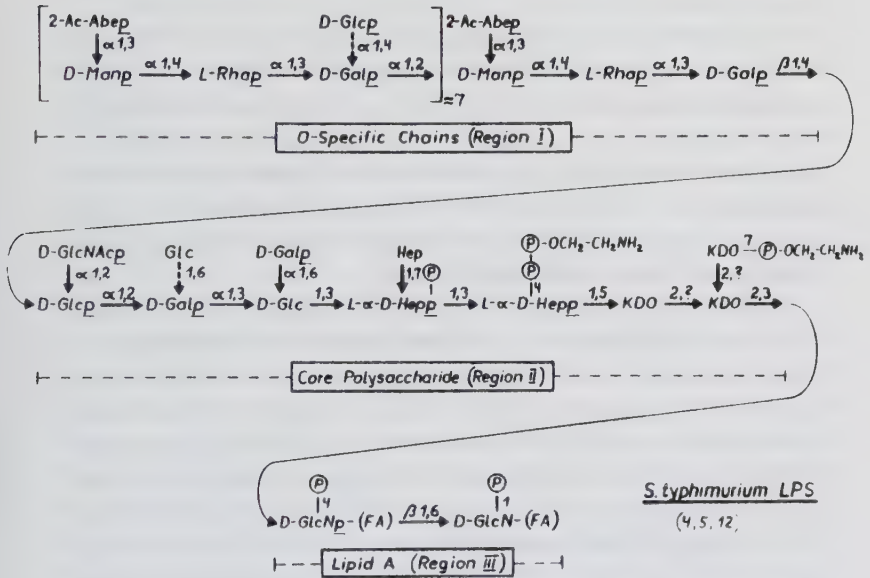


Abb. 3: Struktur des Lipopolysaccharids aus S.typhimurium (aus 24). Abe = Abequose, Ac = Acetyl, FA = langkettige Fettsäuren, Gal = Galaktose, Glc = Glukose, GlcN = Glukosamin, Hep = L-Glycero-D-mannoheptose, KDO = 2-Keto-3-desoxyoctonsäure, Man = Mannose, Rha = Rhamnose, P = Phosphat, p = pyranoside Bindung.

Allgemein lassen sich 3 Regionen in diesen Makromolekülen unterscheiden. Region I ist ein aus sich wiederholenden Oligosacchariden zusammengesetztes Polysaccharid. Es trägt die O-Spezifität des LPS-Moleküls und ist die Grundlage der serologischen Klassifizierung der Bakterien (25). Stämme mit einem vollständigen O-Antigen wachsen auf Agar als glatte

S (smooth) - Kolonien, während der Verlust des O-antigenen Polysaccharids zu rauen R (rough) - Kolonien führt (S-R-Mutation). Region II stellt das Kernoligosaccharid dar, das für alle Salmonella - Spezies identisch ist (26). Region III, das Lipid A, ist für die endotoxischen Eigenschaften des LPS verantwortlich (27).

Es ist schon lange bekannt, daß eine S-R-Mutation mit einem Verlust der Virulenz von Salmonellen verbunden ist (28). Die Bakterien werden dabei empfindlicher für die Lyse durch Komplement und Lysozym (29) und werden auch ohne Opsonisierung schnell phagozytiert (30). Das O-spezifische Polysaccharid der S-Formen kann daher in diesem Zusammenhang als Virulenzfaktor gelten (31). Auch quantitative (32) und qualitative (33) Unterschiede im LPS-Gehalt konnten mit der Virulenz von Salmonella-Stämmen in Verbindung gebracht werden.

Man kennt aber auch viele Beispiele in denen sich eng verwandte S-Formen von Salmonellen deutlich in ihrer Virulenz für Mäuse unterscheiden, obwohl eine große Ähnlichkeit im LPS-Gehalt der Bakterien besteht (16). E.coli-Hybride, die durch genetische Übertragung der Information zur Biosynthese der O-antigenen Faktoren 4, 5 und 12 von S.typhimurium auf E.coli 08 erhalten wurden (34), sind für Mäuse apathogen (35). Daraus wird ersichtlich, daß die Ausprägung einer bestimmten O-Spezifität nicht allein die Virulenz von Salmonellen erklärt.

Da diese apathogenen Hybrid-Bakterien bei parenteraler Infektion Immunität gegen virulente S.typhimurium erzeugen (35), bieten sie sich zur Untersuchung von Mechanismen der Immunabwehr bei Mäusetyphus an.

3.2. Abwehrmechanismen bei Mäusetyphus

Es ist seit langem bekannt, daß die unterschiedliche natürliche Resistenz von Mäuseinzuchtstämmen gegen S.typhimurium genetisch bedingt ist (36,37). S.typhimurium wurde als fakultativ intrazelluläres Bakterium erkannt, da sich virulente Stämme auch nach der Aufnahme in Makrophagen noch vermehren können (38,39,40). Neuerdings konnten die Resistenzunterschiede des infektoresistenten BRVR- und des sensitiven BSVS-Mäusestammes auf Unterschiede in der bakteriziden Kapazität der Makrophagen dieser

Tiere zurückgeführt werden (41,42). Andere Experimentatoren (43) fanden keine Korrelation zwischen der unterschiedlichen Virulenz verschiedener Stämme von S.typhimurium und der in vitro Abtötung durch Makrophagen aus L.A.B.-Mäusen.

Bei den Untersuchungen zur Immunität der Maus gegen Salmonellose wird einerseits die Rolle der humoralen Immunantwort betont (44,45), während andererseits die zelluläre Immunität als ausschlaggebend angesehen wird (19,46). Dabei ist zu beachten, daß für beide Arten der Immunität die Phagozytose und Abtötung durch Makrophagen als der wichtigste Effektor-mechanismus angesehen wird. Die komplementvermittelte Bakterizidie scheint in Mäusen keine wesentliche Rolle zu spielen, da ihr Komplement kaum lytische Aktivität aufweist (47,48). Die Unterschiede der beiden Standpunkte ergeben sich aus den differierenden Ansichten wie die Makrophagen, ausgehend von einem nicht sehr effektiven Normalzustand, in dem sie virulente Salmonellen nur unvollständig abtöten, in einen aktivierten Zustand hoher bakterizider Kapazität versetzt werden. Die Vertreter einer humoralen Immunität nehmen an, daß spezifische Antikörper die bakterizide Aktivität der Makrophagen erhöhen (40,44). Bei der zellvermittelten Immunität wird zwar die opsonisierende Wirkung von Antikörpern anerkannt, die gesteigerte Aktivität der Makrophagen aber als von Antikörpern unabhängig betrachtet (46,49). Für eine entscheidende Beteiligung von T-Zellen bei der Immunität gegen Typhus liegen jedoch bisher nur indirekte Hinweise vor (50,51), während bei Infektionen mit L.monocytogenes, einem ebenfalls fakultativ intrazellulären Parasiten, eine T-zellabhängige Aktivierung der Makrophagen nachgewiesen werden konnte (5,6,7).

Ein Hinweis über den humoralen bzw. zellulären Anteil an einem Immunzustand kann durch passive Immunisierung von normalen Tieren mit Serum oder Lymphozyten von einem immunen Tier und anschließender Belastung erhalten werden. Durch Übertragung von Immunsereen konnten die Empfängertiere nicht gegen Salmonellose geschützt werden (16,19), was gegen eine entscheidende Funktion von humoralen Antikörpern in der Immunität gegen Mäusetyphus spricht. Die passive Immunisierung mittels T-Zellen aus immunen Tieren war jedoch bisher auch nicht erfolgreich (52), was eventuell auf bestimmte Eigenheiten von Salmonella-Infektionen zurückzuführen ist (53).

4. Problemstellung und Ziel der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Infektionsmodell zusammengestellt, das aus relativ infekteresistenten C3Hf-Mäusen und sensitiven C57Bl/6-Mäusen sowie virulenten (SF 1826) und avirulenten (SF 10223) S.typhimurium besteht (54). Das Ergebnis der Infektion bei den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten ist in Tab. 2 in Form der LD₅₀-Werte angegeben.

Mäusestamm	LD ₅₀ (i.p.) von <u>S.typhimurium</u>	
	SF 1826	SF 10223
C3Hf	2×10^4	6×10^5
C57Bl/6	10	1×10^5

Tab. 2: Empfindlichkeit der Mäusestämme C3Hf und C57Bl/6 gegen lebende S.typhimurium (aus 54).

In diesem Infektionsmodell sollten mögliche Effektormechanismen zur Abwehr des Mäusetyphus in resistenten und sensitiven Tieren vergleichend untersucht werden, um Aufschluß über die relative Bedeutung der einzelnen Abwehrmechanismen zu erhalten. Bisherige Versuche hatten ergeben, daß sich die humorale Immunantwort bezüglich agglutinierender, Komplement-aktivierender und opsonisierender Antikörper der verschieden empfindlichen Mäusestämme nicht unterscheidet (54).

Es war das Ziel dieser Arbeit, die Rolle der Makrophagen als Effektorzellen in der Infektabwehr gegen S.typhimurium zu untersuchen. Dazu sollte eine in vitro Technik entwickelt werden, die es erlaubt, zwischen Prozessen der Phagozytose (Anhaftung und Internalisierung der Bakterien) und intrazellulärem Geschehen zu differenzieren. Mit dieser Methode galt es die Frage zu klären, ob eine Korrelation zwischen der natürlichen

Resistenz der verwendeten Mäusestämme und der Fähigkeit ihrer Makrophagen besteht, S.typhimurium verschiedener Virulenz zu phagozytieren und intrazellulär abzutöten. Weiterhin war zu untersuchen, ob und wie sich diese Eigenschaften der Makrophagen während Salmonellen-spezifischen Infektionen und der Ausbildung einer Immunität gegen Mäusetyphus verändern. Diese Untersuchungen sollen die Grundlage schaffen für die Erforschung der bakteriziden Mechanismen der Makrophagen und der Virulenzfaktoren, die es Salmonellen ermöglichen, diesen Mechanismen zu widerstehen.

II. Untersuchungen und Ergebnisse

1. Entwicklung und Charakterisierung eines Systems der in vitro Abtötung von *S.typhimurium* durch Peritonealmakrophagen der Maus

Die Verwendung von Peritonealmakrophagen zur in vitro Kultur hat sich in den letzten Jahren zu einer Standardtechnik entwickelt (55,56). Die wesentlichen Gründe dafür sind technische Einfachheit und Schnelligkeit der Gewinnung sowie hoher Anteil an Makrophagen (ca. 60%) (56) und geringer Gehalt an polymorphnuklearen Leukozyten (< 5%) (57) in der Gesamtpopulation der Peritonealzellen. Diese Umstände ermöglichten es auch, in den meisten Untersuchungen *S.typhimurium* zur Phagozytose intraperitoneal zu injizieren und dann die weitere Abtötung in vitro zu verfolgen (42,46,58). Dadurch waren wohl optimale Bedingungen für die Phagozytose gegeben (43,58), der Prozeß der Abtötung konnte aber in seinem Ausmaß nur als Gesamtreaktion erfaßt werden. Für die von uns angestrebte Analyse und Manipulation der Einzelprozesse - Interaktion der Bakterien mit der Phagozytenmembran, Internalisierung und Mechanismen der Abtötung - war deshalb die Entwicklung eines reinen in vitro Systems Voraussetzung. Dabei sollte versucht werden, soweit dies überhaupt möglich ist, die Prozesse der Phagozytose (Anhaftung und Internalisierung) von denen der Abtötung zeitlich zu trennen.

Da man davon ausgehen kann, daß extrazelluläre Bakterien im höheren Organismus in Kontakt mit Serum kommen, wurden in den hier beschriebenen Versuchen die Bakterien im allgemeinen mit homologem Normalserum als Komplementquelle vorbehandelt. Die Kultivierung der Makrophagen erfolgte ohne Serumzusatz.

Die Entwicklung des in vitro Systems zur Abtötung von *S.typhimurium* wird am Beispiel der Interaktion des avirulenten Stammes SF10223 mit Makrophagen der relativ infektoresistenten C3Hf-Maus beschrieben.

1.1. Untersuchungen mit normalen Makrophagen

Diese Versuche wurden wie unter V.7.1. beschrieben, nur ohne Vorinkubation der Makrophagen mit Antibiotika, durchgeführt.

1.1.1. Nachweis der Abtötung von *S.typhimurium* durch normale Makrophagen

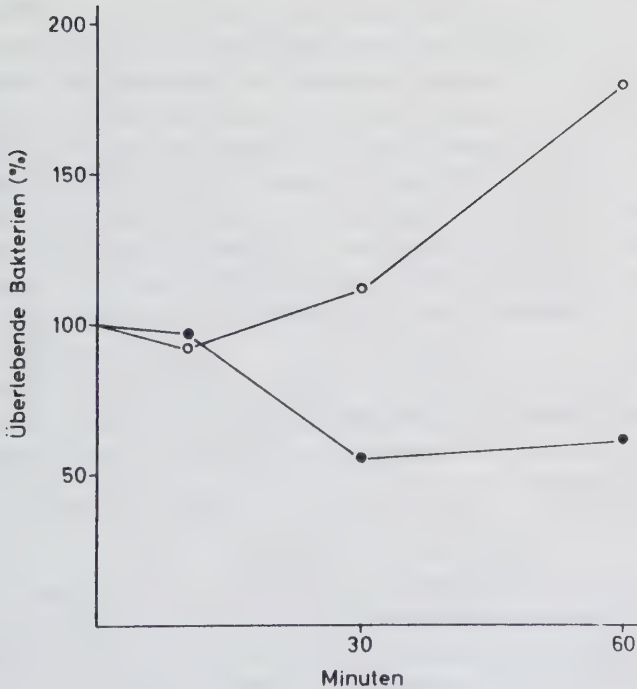


Abb. 4: Nachweis der Abtötung von avirulenten *S.typhimurium* SF10223 durch normale Makrophagen aus infektresistenten C3Hf-Mäusen. Jeweils 10^6 Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 2×10^5 mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Als Kontrollen (—○—) wurden Petrischalen mit Zellkulturmedium aber ohne Makrophagen verwendet. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien sowie der Bakterien in Ansätzen ohne Makrophagen und zu den angegebenen Zeiten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert).

Zu diesem Zweck wurden jeweils 2×10^5 Bakterien, die mit Normalserum opsonisiert waren, in Zellkulturmedium in Petrischalen mit und ohne Makrophagen gegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurden in den Ansätzen mit Makrophagen die freien, nicht an Makrophagen adhärierenden Bakterien mit kaltem PBS abgewaschen. In 3 Schalen wurden zu diesem Zeitpunkt die Makrophagen mit einem Gummispatel abgelöst und dadurch lysiert. Die Anzahl der lebenden Makrophagen-assoziierten Bakterien wurde durch Plattieren eines Aliquots des Lysats bestimmt. In der Abtötungskinetik wurde die Zahl der lebenden Bakterien zu diesem als Zeitpunkt 0 bezeichneten Moment gleich 100% gesetzt. Mehrere Schalen mit Makrophagen und anhaftenden Bakterien wurden nach dem Waschen wieder mit Zellkulturmedium versetzt und weiterinkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden die lebenden Bakterien bestimmt, indem ein Aliquot des Makrophagenlysats, bzw. der Bakteriensuspension bei Ansätzen ohne Makrophagen, plattiert wurde.

Abb. 4 zeigt, daß von den nicht abwaschbaren Bakterien in den Schalen mit Makrophagen bereits nach 30 Minuten ca. 40% abgetötet waren, während sich die in Abwesenheit von Makrophagen gehaltenen Bakterien nach 1 Stunde fast verdoppelt hatten.

1.1.2. Abhängigkeit der Abtötung von *S.typhimurium* durch Makrophagen von der Bakterienkonzentration

Wir haben versucht die relativen Zellzahlen quantitativ zu erfassen. Dazu haben wir zu Kulturen von 10^6 Peritonealzellen steigende Konzentrationen von *S.typhimurium* SF10223 gegeben. Nach 5 Minuten wurden die Makrophagen-assoziierten Bakterien und nach 30 Minuten die Zahl der davon überlebenden Bakterien bestimmt. Es wurde gefunden, daß über den gesamten getesteten Bereich (7×10^4 - 2×10^7 Bakterien/ 10^6 Peritonealzellen) der Anteil der zellassoziierten Bakterien gleichmäßig zwischen 2,6% - 3,6% der insgesamt zugegebenen blieb.

Wie Abb. 5 zeigt, ist bis zu einer Konzentration von 10^6 Bakterien pro 10^6 eingesäten Peritonealzellen (ca. 2×10^5 adhärente Makrophagen) kein Einfluß auf das Ausmaß der Abtötung der Bakterien festzustellen. Die bakterizide Kapazität der Makrophagen ist unter diesen Bedingungen

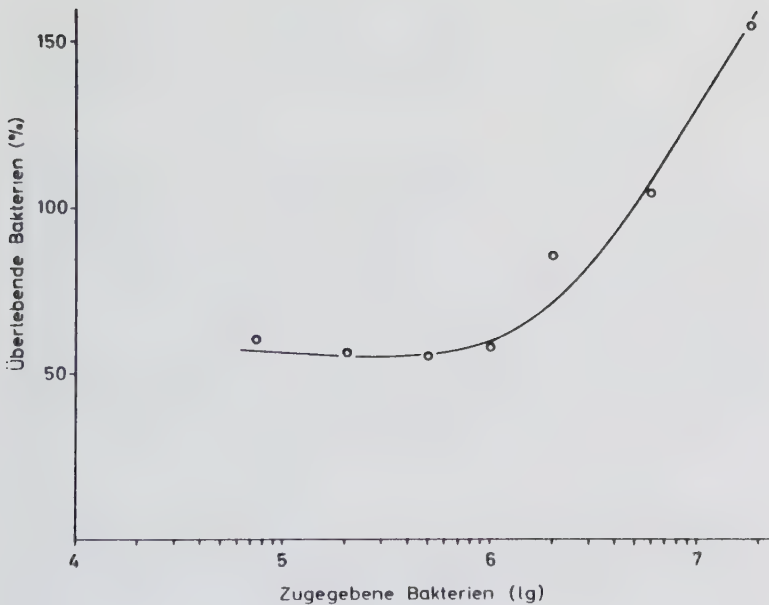


Abb. 5: Abhängigkeit der Abtötung von avirulenten *S.typhimurium* SF10223 durch normale Makrophagen aus C3Hf-Mäusen von der Bakterienkonzentration. Jeweils 10^6 Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden mit Normalserum opsonierte Bakterien in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien, nach weiteren 30 Minuten die Zahl der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert).

keine Funktion des Verhältnisses der Bakterien zu Makrophagen. Das ließ sich auch durch ein umgekehrtes Experiment mit verdoppelter Peritonealzellzahl bei konstanter Bakterienkonzentration (4×10^5) nachweisen: Trotz einer um 60% erhöhten Menge an Makrophagen assoziierter Bakterien blieb die Zahl der überlebenden unverändert (57%).- Bei einem Verhältnis von 5 zugegebenen Bakterien pro Peritonealzelle ist jedoch keine Abtötung mehr zu beobachten.

Eine Bestimmung der Zahl der Makrophagen nach dem Waschen durch Trypsinisieren und Zählen in der Zählkammer ergab $1,9 \times 10^5$ Makrophagen/Petrischale. Bei 7×10^6 zugegebenen Bakterien ist, wie in Kontrollen ohne Makrophagen (vgl. Abb. 4), eine fast ungehinderte Bakterienvermehrung möglich, obwohl sich bei der gemessenen Zahl von Makrophagen-assoziierten Bakterien von durchschnittlich 3,0% erst ein theoretisches Infektionsverhältnis von ungefähr 1 Bakterium/Makrophage ergibt. Das ist zwar zunächst unerwartet, läßt sich aber dadurch erklären, daß eine Makrophagenpopulation aus unbehandelten Mäusen bezüglich des Reifezustands der einzelnen Zellen nicht homogen ist (44). So konnte z.B. in Phagozytosestudien (42) gezeigt werden, daß nur 30% einer Mäuse-Makrophagenpopulation mit Normalserum opsonisierte S.typhimurium aufnehmen, wobei die Zahlen der assoziierten Bakterien/Makrophagen Schwankungen bis zu einem Faktor von 10 aufwiesen. Zudem konnten Gelzer und Suter (39) demonstrieren, daß, sobald die bakterizide Kapazität von infizierten Makrophagen überfordert ist, praktisch unmittelbar eine intrazelluläre Vermehrung der Salmonellen eintreten kann, die innerhalb weniger Stunden zu zytotoxischen Effekten führt.

In unseren Untersuchungen konnten wir bei Verhältnissen von 10 und mehr zugegebenen S.typhimurium/Peritonealzelle bereits nach 20 Minuten morphologische Veränderungen der Makrophagen feststellen, obwohl die freien Bakterien gewaschen worden waren. Gab man nach 1 Stunde noch Penicillin und Streptomycin zu, um extrazelluläre Vermehrung zu vermeiden, so waren nach einem weiteren Tag viele abgerundete tote Zellen zu sehen und der Makrophagenrasen war deutlich gelichtet. Diese Beobachtungen konnten wir bei Peritonealzellkulturen, denen weniger als 10 Bakterien/Peritonealzelle zugesetzt wurden, nicht machen.

1.2. Untersuchungen mit aktivierten Makrophagen

In unseren Untersuchungen ist das entscheidende Kriterium für aktivierte Makrophagen, verglichen mit normalen Makrophagen, die erhöhte bakterizide Kapazität. Analog den Experimenten von Blanden et al. (46) dienten uns aktiv infizierte Tiere als Quelle für aktivierte Makrophagen. Dabei interessierten uns die Veränderungen im bakteriziden Verhalten der Makrophagen, wie sie gerade während S.typhimurium-spezifischen Infektionen auftreten. Gegenüber den Testbedingungen bei normalen Makrophagen erforderte dies zunächst zwei Veränderungen: a.) Da die gewonnenen Peritonealzellsuspensionen zum Teil noch Infektionskeime enthielten, wurden sie bis 2 Stunden vor Zugabe der Bakterien in Medium mit Penicillin und Streptomycin inkubiert. b.) Die Kultivierungsdauer der Makrophagen wurde von 24 Stunden auf 6 Stunden verkürzt, da zunächst nicht bekannt war, wie lange Makrophagen aus infizierten Mäusen ihren erhöhten Aktivitätszustand unter in vitro Bedingungen beibehalten. Die Auswirkungen dieser veränderten Parameter sind unter II.1.3.1. beschrieben.

1.2.1. Bakterizide Aktivität von Makrophagen aus S.typhimurium SF10223-infizierten C3Hf-Mäusen in Abhängigkeit des Infektionsverlaufs

Wir mußten zuerst klären, wann während einer aktiven Infektion der Mäuse mit S.typhimurium Veränderungen in der bakteriziden Kapazität der Makrophagen auftreten. Die Kinetik der Aktivitätsänderung von Makrophagen hängt dabei im wesentlichen von den infizierenden Organismen und der Infektionsdosis ab (49). Wir haben C3Hf-Mäuse mit 2×10^3 lebenden avirulenten S.typhimurium SF10223 intraperitoneal infiziert. Die Tiere überleben diese Infektion ($LD_{50} : 6 \times 10^5$) und sind danach immun, d.h. gegen eine Belastung mit mindestens der 100-fachen LD_{50} des virulenten S.typhimurium SF1826 geschützt (vgl. 54). Wir haben die bakterizide Aktivität der Makrophagen gegen S.typhimurium SF10223 während des Infektionsverlaufs in vitro untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 zusammengefaßt.

Bis zum 7. Tag ist die Aktivität von Makrophagen aus infizierten Tieren nicht wesentlich von normalen Makrophagen verschieden, während sie anschließend bis zum 24. Tag deutlich erhöht ist.

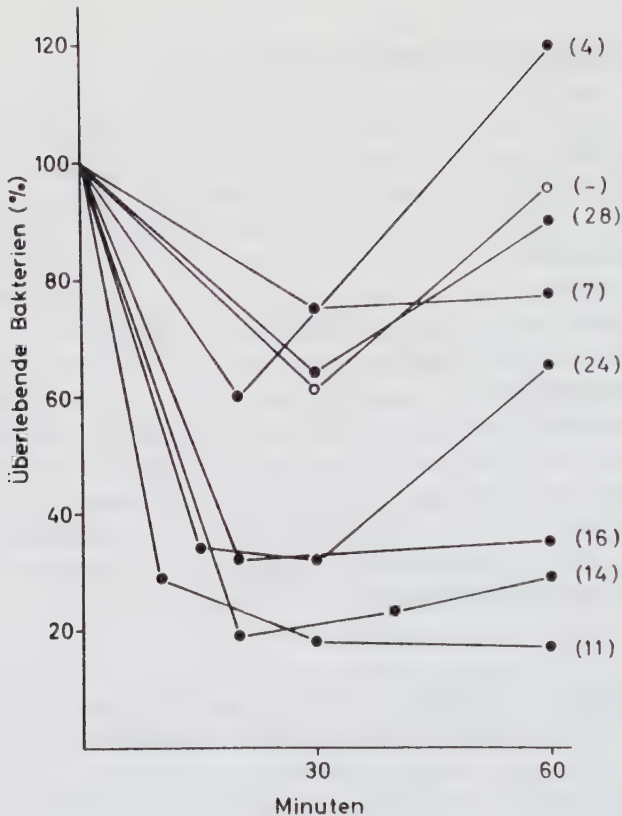


Abb. 6: Abtötung von avirulenten *S.typhimurium* SF10223 durch aktivierte Makrophagen aus infektresistenten C3Hf-Mäusen zu verschiedenen Zeiten nach Aktivierung. Die Aktivierung erfolgte durch i.p. Infektion der Mäuse mit 2×10^3 lebenden *S.typhimurium* SF10223. Jeweils 10^6 Peritonealzellen von infizierten (●) oder normalen (○) Mäusen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 6 Stunden wurden $1 - 2 \times 10^5$ mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und zu den weiteren angegebenen Zeiten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert). Die Zahlen in Klammern geben die Tage nach Infektion der Tiere an.

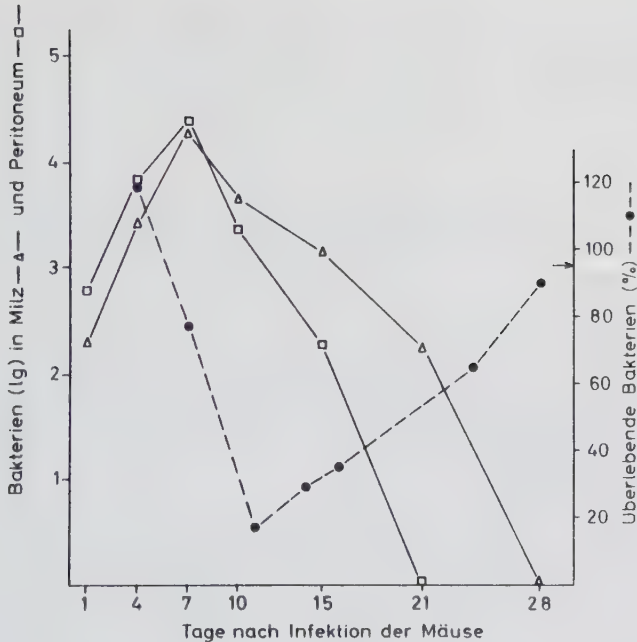


Abb. 7: Persistenz von avirulenten S.typhimurium SF10223 in Milz (Δ) und Peritoneum (□) von infektresistenten C3Hf-Mäusen und die bakterizide Aktivität der Makrophagen gegen S.typhimurium SF10223 in vitro. 2×10^3 S.typhimurium SF10223 wurden i.p. injiziert. Die Keimzahlen (Kolonienbildung) pro Milz und Peritoneum sind Mittelwerte aus 3 - 4 Mäusen. Zur Bestimmung der bakteriziden Aktivität der Makrophagen wurden jeweils 10^6 Peritonealzellen in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 6 Stunden wurden $1 - 3 \times 10^5$ mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach weiteren 60 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien (●) durch Plattieren bestimmt (siehe Abb. 6). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert). Der Pfeil gibt die Abtötung der Bakterien durch normale Makrophagen an.

In der Hoffnung, diese gefundene Zeitabhängigkeit der Makrophagenaktivierung mit dem Infektionsverlauf korrelieren zu können, haben wir die Keimzahlen in den Mäusen verfolgt. S.typhimurium bildet bei Infektionen in der Maus primäre Infektionsherde in Milz und Leber (17). Die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien ist Ausdruck der bakteriellen Virulenz und der Resistenz des Wirts (59). Dabei geben wir vor allem die Keimzahlen in der Milz den Infektionsverlauf am besten wieder (60). Wir haben außerdem die Persistenz im Peritoneum verfolgt, da die Infektion experimentell hier gesetzt war und auch die Makrophagen aus dem Peritoneum entnommen wurden.

Wie Abb. 7 zu entnehmen ist, kommt es zunächst zu einer gleichlaufenden Vermehrung der Bakterien in Milz und Peritoneum, die nach 7 Tagen ihr Maximum erreicht. Das ist gefolgt von einem gleichmäßigen Abnehmen der Keime. Nach 21 Tagen ist das Peritoneum, nach 28 Tagen die Milz keimfrei.

Dieser Infektionsverlauf spiegelt sich wider in der Aktivität der Makrophagen, S.typhimurium SF10223 in vitro abzutöten. Erst nach 7 Tagen ist eine erhöhte bakterizide Aktivität nachweisbar. Dies deckt sich auch mit den in vivo Untersuchungen, wie Eliminierung von Sekundärinfektionen in Milz und Leber, von Mackaness et al. (19) und Zinkernagel (53). Die Aktivität der Makrophagen, mit dem Maximum um den 11. Tag, nimmt dann langsam mit der Keimzahl in der Milz ab. Nach 28 Tagen, wenn die Milz - und damit sehr wahrscheinlich das ganze Tier - wieder frei von Salmonellen ist, haben die Makrophagen die ursprüngliche Aktivität wieder erreicht. Auch dies entspricht dem in vivo beobachteten Verhalten (46,53,61): Je größer die Restpopulation der Primärinfektionskeime ist, desto schneller erfolgt die Eliminierung einer Sekundärinfektion. Die von uns in vitro erzielten Ergebnisse bezüglich der bakteriziden Aktivität der Makrophagen korrelieren also mit den Verhältnissen in vivo.

Mit den Erfahrungen der hier beschriebenen Versuche wurden als aktivierte Makrophagen solche aus C3Hf-Mäusen, 11 - 15 Tage nach Infektion mit S.typhimurium SF10223, verwendet. Eine Beeinträchtigung der Abtötung durch persistierende Impfkeime in den Makrophagen kann ausgeschlossen werden. Denn ihre Zahl beträgt sowohl am Tag 4 als auch am Tag 11 nur ca. 500 Bakterien/ 10^6 Peritonealzellen (Abb. 7) bei einer gewonnenen Gesamtzellzahl von 10^7 Peritonealzellen/Maus (siehe V.6.2.). Trotzdem verhalten

sich nach 4 Tagen gewonnene Makrophagen wie normale, und solche nach 11 Tagen ergeben eine maximale Abtötung von 80%, wie sie auch mit keimfreien aktivierten Makrophagen erhalten wird (siehe im folgenden Abschnitt 1.2.2).

1.2.2. Verwendung eines E.coli-S.typhimurium-Hybrids zur Gewinnung aktivierter Makrophagen aus C3Hf-Mäusen

Der Hybridstamm F1142 entstand durch Übertragung der O-Faktoren 4, 5, 12 von S.typhimurium auf E.coli 08 (62). Derartige Hybride sind für Mäuse apathogen, vermitteln aber als Lebendvakzine in NMRI-Mäusen bei intraperitonealer Applikation Immunität gegen S.typhimurium (35,62). Außerdem persistieren diese Hybride in Mäusen viel kürzer als avirulente S.typhimurium (62). Wir haben deshalb untersucht, ob sich die schnellere Eliminierung dieser Infektionskeime auch für den Zweck der Gewinnung aktivierter Makrophagen vorteilhaft auswirkt. - Die letale Dosis des Hybridstammes F1142 für C3Hf-Mäuse ist größer als 10^8 . Wir haben den Tieren 10^7 lebende Bakterien intraperitoneal injiziert.

Wie in Abb. 8 dargestellt, wurde auch dieser Keim nach kurzer Zeit in der Milz gefunden. Im Gegensatz zu S.typhimurium tritt aber keine Vermehrung ein, sondern die Zahl der lebenden Bakterien nimmt vom ersten Auftreten an stetig ab. Das Peritoneum ist nach 4 Tagen, die Milz nach 15 Tagen wieder keimfrei.

Wohl durch die geringere Virulenz bedingt, sind in diesem Infektionsmodell die Makrophagen bereits nach 4 Tagen optimal zur Bakterientötung aktiviert. Die Aktivierung läßt dann langsam nach, bis alle Keime aus der Milz eliminiert sind. - Da in diesem System das Peritoneum bereits 4 Tage nach der Infektion keimfrei ist, wurden in den folgenden Versuchen aktivierte Makrophagen aus F1142-infizierten C3Hf-Mäusen 5 - 10 Tage nach der Infektion gewonnen.

In diesem Zeitraum ist die Zahl der Peritonealzellen/Maus gegenüber normalen Tieren etwa 3-fach erhöht (siehe V.6.2.). Deshalb sollte geprüft werden, ob die gesteigerte bakterizide Fähigkeit von Makrophagen aus infizierten Tieren nicht auf einen erhöhten Makrophagenanteil an der Peritonealzellpopulation, verglichen mit dem aus normalen Mäusen, zurück-

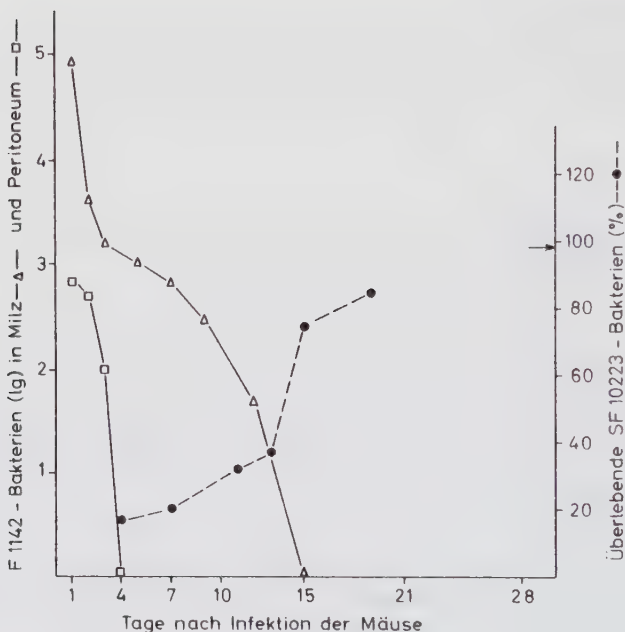


Abb. 8: Persistenz des E.coli-S.typhimurium-Hybrids F1142 in Milz (Δ) und Peritoneum (□) von C3Hf-Mäusen und die bakterizide Aktivität der Makrophagen gegen S.typhimurium SF10223 in vitro. 10^7 lebende Hybrid-Bakterien wurden i.p. injiziert. Die erhaltenen Keimzahlen (Kolonienbildung) pro Milz und Peritoneum sind Mittelwerte aus 3 - 4 Mäusen. Zur Bestimmung der bakteriziden Aktivität der Makrophagen wurden jeweils 10^6 Peritonealzellen in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 6 Stunden wurden $1 - 5 \times 10^5$ mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach weiteren 60 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien (●) durch Plattieren bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert). Der Pfeil gibt die Abtötung der Bakterien durch normale Makrophagen an.

zuföhren ist. Eine Bestimmung des Anteils adhätierender Makrophagen unter den Peritonealzellen durch Zählen in der Zählkammer war aber nur mit Zellen aus normalen Mäusen möglich, da sich aktivierte Makrophagen nicht mehr ablösen ließen. Ein quantitativer Vergleich der Makrophagenpopulationen aus normalen und infizierten Tieren wurde deshalb auf Proteinbasis durchgeführt. Dazu wurden jeweils 2×10^6 Peritonealzellen aus normalen Mäusen oder aus Mäusen 6 Tage nach Infektion mit dem Hybridstamm F1142 in Petrischalen eingesät. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Proteingehalt der anhaftenden Zellen bestimmt. Für normale Makrophagen ergaben sich $51 \pm 4 \mu\text{g}$, für aktivierte $38 \pm 2 \mu\text{g}$ Protein/Petrischale (Mittelwerte aus 5 Bestimmungen). Der optische Vergleich der Rasendichte dieser Makrophagen vermittelte eine ähnliche Relation. Die verstärkte bakterizide Aktivität in vitro von Makrophagen aus infizierten Mäusen, verglichen mit der von Makrophagen aus normalen Mäusen, ist also sicher nicht auf eine vermehrte Makrophagenzahl zurückzuführen, sondern Ausdruck der gesteigerten Abtötungskapazität der einzelnen Zellen.

1.3. Charakterisierung der bakteriziden Aktivität normaler und aktivierter Makrophagen

In den folgenden Versuchen haben wir verschiedene Parameter, welche die bakterizide Aktivität von Markophagen beeinflussen können, an dem oben beschriebenen System untersucht. Dabei wurde das Verhalten normaler und aktivierter Makrophagen verglichen.

1.3.1. Einfluß der Kultivierungsdauer von Makrophagen und der Vorinkubation mit Antibiotika

In den vorangehenden Versuchen mit aktivierten Makrophagen wurde die bakterizide Kapazität der Makrophagen bereits nach 6 Stunden Inkubation untersucht. Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob aktivierte Makrophagen ihre erhöhte Abtötungsfähigkeit auch bei längerer Kultivierungsdauer beibehalten und ob die Dauer der in vitro Inkubation die Abtötungskapazität normaler Makrophagen beeinflusst.

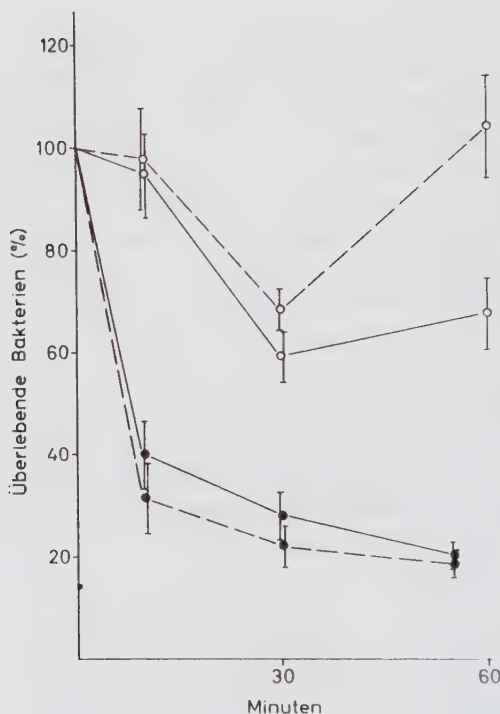


Abb. 9: Einfluß der Kultivierungsdauer normaler und aktivierter C3Hf-Makrophagen auf die Abtötung von *S.typhimurium* SF10223. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgte durch i.p. Infektion der Mäuse mit 10^7 lebenden Bakterien des *E.coli*-*S.typhimurium*-Hybrids F1142. Jeweils 10^6 Peritonealzellen aus normalen (o) oder infizierten (●) Mäusen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 6 (---) bzw. 24 (—) Stunden ohne Antibiotika wurden 5×10^5 mit Normalserum opsonisierte *S.typhimurium* SF10223 zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und zu den angegebenen weiteren Zeiten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SA von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert) angegeben.

Wie Abb. 9 zeigt, ist die Abtötungskapazität von aktivierten Makrophagen nach 24 Stunden noch praktisch unverändert. Bei normalen Makrophagen hingegen ist ein Einfluß der Kultivierungsdauer auf die bakterizide Aktivität der Makrophagen zu beobachten. So ist die nach 30 Minuten erreichte maximale Abtötung der Bakterien durch 24 Stunden alte, gegenüber 6 Stunden alten, Makrophagenkulturen leicht erhöht. Noch deutlicher aber wird der Unterschied nach 60 Minuten. Während bei 24 Stunden alten Makrophagenkulturen die Zahl der überlebenden Bakterien nach 30 und 60 Minuten praktisch gleich bleibt, tritt bei 6 Stunden alten Kulturen ab 30 Minuten bereits wieder eine deutliche Vermehrung der verbliebenen Bakterien ein. Zwei Möglichkeiten sind für diese leichte Aktivitätszunahme der bakteriziden Kapazität normaler Makrophagen nach 24-stündiger Kultivierung denkbar:

- a.) Eine gewisse Stimulierung durch die in vitro Bedingungen ist nicht auszuschließen und wird anhand von anderen Aktivitätsparametern, wie Phagozytose von Erythrozyten (63) oder dem Gehalt an Ribonukleinsäure der Makrophagen (64), zumindest bei mehrtägiger Inkubation, auch diskutiert.
- b.) Wir konnten beobachten, daß normale Makrophagen zu ihrer vollen Ausbreitung mindestens 12 Stunden benötigen, während aktivierten Makrophagen dazu schon 1 - 2 Stunden genügen. Um gleichwertigere Bedingungen zu schaffen, wurden in den folgenden Versuchen Makrophagen aus 24-stündigen Kulturen verwendet.

Die Tatsache, daß mit Peritonealzellkulturen aus normalen und infizierten Tieren die bakterizide Aktivität nach einer Inkubation von 24 Stunden nicht abnimmt, zeigt auch, daß an der beobachteten Abtötung der Bakterien keine kurzlebigen Granulozyten beteiligt sind (43).

Wir haben außerdem untersucht, ob die Kultivierung der Makrophagen mit Antibiotika deren bakterizide Kapazität erhöht. Über die Aufnahme von Penicillin und Streptomycin in Phagozyten widersprechen sich die Angaben in der Literatur. Holmes et al. (65) berichten, daß diese Antibiotika nicht in Phagozyten aufgenommen werden. Andere Autoren (66) weisen aber darauf hin, daß eine verstärkte Abtötung von Mycobakterium tuberculosis durch aktivierte Makrophagen auf eine verstärkte Aufnahme dieser Antibiotika gegenüber normalen Makrophagen zurückgeführt werden kann. Da die von uns verwendeten Bakterienstämme gegen die eingesetzte Antibiotikakombination (100 µg Streptomycin/ml und 100 I.E. Penicillin/ml)

sensitiv sind, wurde der in Abb. 9 dargestellte Versuch in folgender Abwandlung durchgeführt: Die Makrophagen wurden jeweils bis zu 2 Stunden vor Zugabe der Bakterien in antibiotikahaltigem Medium inkubiert, das dann durch antibiotikafreies ersetzt wurde. Für die Abtötungskinetik der Bakterien durch normale und aktivierte Makrophagen ergab sich unter diesen Bedingungen das gleiche Bild wie in Abb. 9. Die Vorinkubation mit Penicillin und Streptomycin beeinflusst also unter den angewendeten Bedingungen weder die Abtötung durch normale noch durch aktivierte Makrophagen. Um die Wahrscheinlichkeit einer Infektion möglichst gering zu halten, wurde deshalb in den weiteren Versuchen die Kultivierung der Makrophagen mit diesen Antibiotika vorgenommen.

1.3.2. Abtötungskinetik normaler und aktivierter Makrophagen

Bevor weitere Untersuchungen über die bakterizide Aktivität der Makrophagen unternommen wurden, haben wir versucht, durch eine ausführliche Kinetik der Abtötung von S.typhimurium SF 10223 die charakteristischen Unterschiede in der bakteriziden Kapazität zwischen normalen und aktivierten Makrophagen aufzuzeigen. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 10 dargestellt.

Bei normalen Makrophagen ist erst ab 15 Minuten nach dem Abwaschen der freien Bakterien eine Abtötung der an Makrophagen assoziierten Bakterien erkennbar. Diese hat ihr Maximum von 40% nach 30 Minuten erreicht. Danach wurde eine langsam eintretende Vermehrung der Bakterien beobachtet. Bei aktivierten Makrophagen dagegen ist die Abtötung der Bakterien schon nach 7 Minuten im Gange, wobei die maximale Abtötung von 80% bereits nach 15 Minuten erreicht ist. Die Zahl der restlichen überlebenden Bakterien bleibt aber bis mindestens 90 Minuten unverändert. Blanden et al. (46) hatten die Phagozytose in vivo durchgeführt und nur die Abtötung der Bakterien in vitro verfolgt. Sie kamen zu dem gleichen zeitlichen Verlauf der Abtötung von S.typhimurium wie wir.

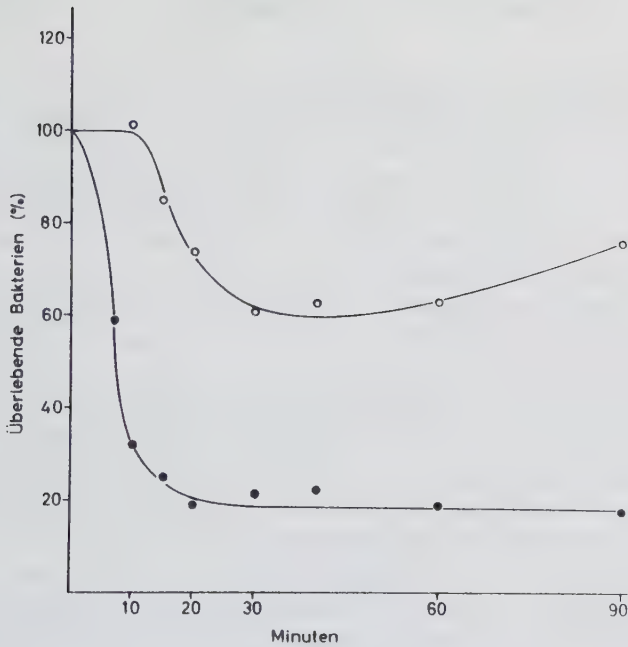


Abb. 10: Abtötungskinetik von avirulenten *S.typhimurium* SF10223 durch normale und aktivierte Makrophagen aus C3Hf-Mäusen. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgte durch i.p. Infektion der Mäuse mit 10^7 lebenden Bakterien des *E.coli-S.typhimurium*- Hybrids F1142. Jeweils 10^6 Peritonealzellen aus normalen (o) oder infizierten (●) Mäusen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 3×10^5 mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und zu den weiteren angegebenen Zeiten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert).

1.3.3. Einfluß der Opsonisierung von *S.typhimurium* auf die Interaktion mit normalen und aktivierten Makrophagen

Eine Beteiligung von Serumfaktoren (Antikörper und Komplement) wird sowohl für Prozesse der Aufnahme als auch der Abtötung von Bakterien durch Phagozyten diskutiert (44,46,67). In den bisherigen Versuchen hatten wir die Bakterien immer mit Normalserum opsonisiert. In diesem Abschnitt sind Experimente beschrieben, in denen wir den Einfluß der Vorbehandlung der Bakterien mit verschiedenen Seren auf die Interaktion der Bakterien mit Makrophagen untersucht haben.

Homologes Normalserum aus nicht infizierten Mäusen diente als Komplementquelle. Es wurde unter strikter Eiskühlung gewonnen, um die Komplementaktivität zu erhalten. Die verwendeten Stämme von *S.typhimurium* agglutinieren in diesem Serum nicht. Es wurde in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Interferenzen mit komplementvermittelter Bakterizidie sind bei Mäuseseren, deren lytische Aktivität sehr gering ist (47), praktisch nicht zu erwarten. Wir haben gefunden, daß alle untersuchten Bakterien gegen das verwendete Komplement resistent sind.

Als Antiserum wurde homologes Serum verwendet, das aus Tieren 42 Tage nach Immunisierung mit 10^3 lebenden *S.typhimurium* SF10223 erhalten worden war. Es hatte einen Agglutinationstiter von 1:64, der auch nach Behandlung mit Dithiotreitol unverändert blieb. Dithiotreitol spaltet das Makromolekül IgM in seine Untereinheiten (68) und der verbleibende Titer kann hauptsächlich IgG zugeschrieben werden (69). Das Antiserum wurde so gewonnen (V.4.2.1.), daß das enthaltene Komplement inaktiviert wurde. Es stellt somit nur eine Antikörperquelle und keine Komplementquelle dar. Zudem wurde es in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, um Komplikationen durch Agglutination bei der Bestimmung der Bakterienzahlen zu vermeiden. In einer solchen Verdünnung ist Komplement nicht mehr aktiv.

Wie Tab. 3 zeigt, hat bei normalen Makrophagen sowohl Antiserum als auch Normalserum einen starken opsonisierenden Effekt, der sich bei den hier verwendeten Serumverdünnungen in einer 20 - 30-fachen Zunahme der an Makrophagen assoziierten Bakterien ausdrückt, verglichen mit nicht opsonisierten Bakterien. Ähnliche Resultate sind auch bei *in vivo* Experimenten erzielt worden (42,46,58). Auf die apparente Reduktion der Assoziation der

Bakterien opsonisiert mit	Bakterien (%) assoziiert an Makrophagen		Überlebende Bakterien(%) bei Makrophagen	
	normal	aktiviert	normal	aktiviert
—	0,13 $\pm$ 0,1 (4)	0,9 $\pm$ 0,3 (8)	61 $\pm$ 8 (4)	24 $\pm$ 4 (8)
AS	2,8 (1)	n.b.	58 (1)	n.b.
NS	3,6 $\pm$ 0,9 (7)	3,4 (2)	60 $\pm$ 7 (5)	25 (1)
NS+AS	2,3 $\pm$ 0,3 (3)	3,7 $\pm$ 0,6 (4)	61 $\pm$ 7 (3)	24 (2)

Tab. 3: Einfluß der Opsonisierung von avirulenten *S.typhimurium* SF10223 auf Bindung und Abtötung durch normale und aktivierte Makrophagen von infektresistenten C3Hf-Mäusen. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgte durch i.p. Infektion der Mäuse mit 10^7 lebenden Bakterien des *E.coli-S.typhimurium*-Hybrids F1142. Jeweils 10^6 Peritonealzellen aus normalen oder infizierten Mäusen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $5 - 10 \times 10^5$ nicht opsonisierte bzw. $1 - 4 \times 10^5$ mit Antiserum (AS) und/oder Normalserum (NS) opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach weiteren 30 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt (Triplikate, doppelt plattiert). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von mehreren Versuchen, deren Anzahl durch die Zahlen in Klammern angegeben ist.

n.b. = nicht bestimmt.

Bakterien an Makrophagen bei der als optimal anzusehenden Opsonisierung mit Normalserum und Antiserum wird in späteren Versuchen eingegangen.

Bei aktivierten Makrophagen kommen Opsonisierungseffekte nur schwach zum Ausdruck; denn hier liegt, verglichen mit normalen Makrophagen, schon eine deutlich gesteigerte Aufnahme von nicht opsonierten Bakterien vor. Diese allgemein erhöhte Phagozytosebereitschaft aktivierter

Makrophagen, bei der eine Opsonisierung nur noch eine untergeordnete Rolle spielt, ist auch bei der Aufnahme von E.coli beschrieben worden (58).

Ein Einfluß der Opsonisierung auf Kinetik und Ausmaß der hier untersuchten Abtötung konnte in keiner der Kombinationen festgestellt werden. (In Tab. 3 sind deshalb nur die überlebenden Bakterien nach 30 Minuten aufgeführt). Dieser Punkt wird aber in den nachfolgenden Kapiteln noch mehrmals aufgegriffen werden.

2. Abtötung von S.typhimurium SF10223 und SF1826 durch Makrophagen von C3Hf- und C57Bl/6-Mäusen

Die im vorangehenden Kapitel dargestellte Technik soll im folgenden bei der Analyse der Infektion von resistenten C3Hf- und sensitiven C57Bl/6-Mäusen mit avirulenten (SF10223) und virulenten (SF1826) S.typhimurium angewendet werden. Dabei sollte festgestellt werden, ob sich das Resistenzverhalten des Tieres, wie es durch LD₅₀-Werte ausgedrückt werden kann, mit der in vivo Abtötungskapazität seiner Makrophagen korrelieren läßt. Trotz zahlreicher Untersuchungen war eine solche Korrelation nicht klar gegeben. Rowley und Whitby (43) stellten fest, daß bei L.A.B.-Mäusen keine Korrelation zwischen der Abtötung von S.typhimurium und auch anderer gram-negativer Bakterien mit deren Virulenz besteht. Aus den Untersuchungen anderer Autoren (41,70) an anderen Mäusen ergaben sich jedoch Hinweise auf eine derartige Beziehung. So hatten in vivo Experimente an BRVR- und BSVS-Mäusen zunächst eine entscheidende Rolle des retikuloendothelialen Systems (RES) nahegelegt. Dies wurde dann bestätigt durch die erhöhte Fähigkeit von Makrophagen des resistenten BVRV-Stammes, virulente S.typhimurium SR-11 in vitro abzutöten (42). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit Makrophagen aus sensitiven Swiss-Webster Mäusen erzielt, die in vitro nur den avirulenten S.typhimurium M206, nicht aber den virulenten Stamm C5 abtöten konnten (40).

2.1. Vergleich der bakteriziden Kapazität normaler Makrophagen

Die Zahl der pro Tier gewonnenen Peritonealzellen war bei C57Bl/6-Mäusen etwas größer als bei C3Hf-Mäusen (ca. $3,2 \times 10^6$ gegenüber $2,4 \times 10^6$). Der Anteil an adhärierenden Makrophagen unter den Peritonealzellen war aber bei beiden Mäusestämmen gleich ($96 \pm 2\%$ bzw. $97 \pm 2\%$). So konnten, wie in den vorangegangenen Experimenten mit Makrophagen aus C3Hf-Mäusen, auch jeweils 10^6 Peritonealzellen von C57Bl/6-Mäusen in Petrischalen eingesät werden. Zur Bestimmung der bakteriziden Kapazität der Makrophagen beider Mäusestämme wurden avirulente und virulente Bakterien in der gleichen Konzentration eingesetzt (2×10^5 Bakterien pro 10^6 Peritonealzellen). Die Bakterien waren jeweils mit dem homologen Normalserum opsonisiert worden. In Abb. 11 ist ein repräsentatives Experiment zur Interaktion von avirulenten und virulenten S.typhimurium mit normalen Makrophagen von infektresistenten C3Hf- und infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen wiedergegeben.

Das Ausmaß der Bakterien-Makrophagen-Assoziation (siehe Legende zu Abb. 11) war annähernd gleich. Dies bedeutet, daß virulente und avirulente Bakterien nach Opsonisierung mit Normalserum an die Makrophagen beider Mäusestämme gleich gut gebunden werden. Es steht auch im Einklang mit der bei beiden Mäusestämmen gleichen Eliminierungsrate der Bakterien aus dem Blutkreislauf (41,54,70). Diese als "blood-clearance" bezeichnete Eliminierung wird ja generell durch das RES geleistet (71) und zirkulierende neutrophile Leukozyten sind daran im allgemeinen praktisch nicht beteiligt (72).

In der Abtötung von S.typhimurium SF 10223 und SF 1826 durch C3Hf-Makrophagen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Beide Bakterienstämme werden zu etwa 40 - 50% abgetötet, wobei sich allerdings für den virulenten Stamm SF1826 generell eine geringfügig schwächere Abtötung beobachten ließ. Die LD_{50} -Werte für C3Hf-Mäuse betragen nach intraperitonealer Injektion von lebenden S.typhimurium 6×10^5 avirulente SF10223 bzw. 2×10^4 virulente SF1826 pro Maus (54).

Ganz anders sind dagegen die Ergebnisse mit Makrophagen des sensitiven C57Bl/6-Stammes. Während avirulente S.typhimurium SF10223 in ähnlichem Maß abgetötet werden (ca. 35%) wie durch C3Hf-Makrophagen, vermehren sich virulente SF1826 Bakterien auf den Makrophagenrasen

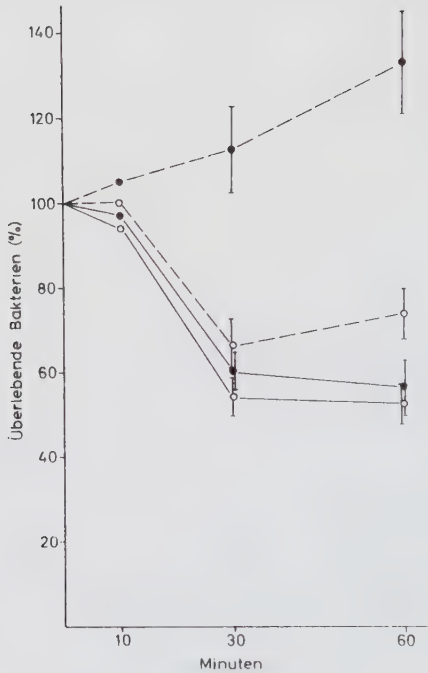


Abb. 11: Abtötung von avirulenten (SF10223) (o) und virulenten (SF1826) (●) *S. typhimurium* durch normale Makrophagen von infektoresistenten C3Hf- (—) und infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen (---). Jeweils 10^6 Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 2×10^5 mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und zu den weiteren angegebenen Zeiten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Der Anteil der Makrophagen-assoziierten avirulenten bzw. virulenten Bakterien betrug bei C3Hf-Makrophagen $3,8 \pm 0,3\%$ bzw. $4,1 \pm 0,4\%$ und bei C57Bl/6-Makrophagen $4,7 \pm 0,4\%$ bzw. $4,1 \pm 0,3\%$. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert).

von Anfang an. Die entsprechenden LD_{50} -Werte für C57Bl/6-Mäuse sind 10^5 avirulente S.typhimurium SF10223 bzw. 10 virulente S.typhimurium SF1826 pro Maus (54).

Jenkin hat in mehreren früheren Arbeiten darauf hingewiesen (40,73,74), daß sowohl Antikörper als auch Komplement und eventuell weitere Serumkomponenten nicht nur für die Phagozytose (Aufnahme), sondern auch für die Abtötung vor allem virulenter Salmonellen durch Makrophagen entscheidende Faktoren seien. Um zu prüfen, ob die Abtötung virulenter S.typhimurium SF1826 durch Makrophagen der beiden hier verwendeten Mäusestämme von der Opsonisierung abhängt, haben wir folgende Untersuchungen angestellt. Eine eventuelle Beteiligung von Antikörpern an der Abtötung dieser virulenten Bakterien durch Makrophagen wurde auf zweierlei Arten getestet, wobei für die Abtötung durch die Makrophagen beider Mäusestämme möglichst adäquate Bedingungen geschaffen wurden. a.) Die Normalseren beider Mäusestämme wurden in der Kälte mit UV-getöteten Bakterien des virulenten Stammes absorbiert, um eventuell vorhandene natürliche Antikörper zu entfernen. Sollte die Fähigkeit der C3Hf-Makrophagen, auch den virulenten Stamm abzutöten, auf der Anwesenheit von Antikörpern im Normalserum beruhen, so dürften virulente Bakterien, die mit absorbiertem Serum opsonisiert sind, nicht abgetötet werden. b.) Zu absorbierten Normalseren wurden die homologen Antiseren in einer Verdünnung zugesetzt, die jeweils dicht unterhalb des Agglutinationstiters lag. Würden Bakterien, die mit dieser Serumkombination opsonisiert sind, stärker durch Makrophagen abgetötet als solche, die mit absorbiertem Normalserum opsonisiert sind, so wäre dies auch ein Beweis für die Beteiligung von Antikörpern an der bakteriziden Wirkung der Makrophagen.

Um einen möglichen Unterschied der Normalseren der beiden verwendeten Mäusestämme auch in den Nicht-Antikörper-Opsoninen zu erfassen, wurden zu Makrophagen auch Bakterien gegeben, die mit dem heterologen Normalserum opsonisiert waren. Sollte Normalserum von C3Hf-Mäusen opsonisierende Komponenten enthalten, die für die Abtötung virulenter Salmonellen durch Makrophagen essentiell sind, so dürfte keine Abtötung von Bakterien, die mit Normalserum von C57Bl/6-Mäusen behandelt sind, durch C3Hf-Makrophagen stattfinden.

Bakterien opsonisiert mit	Bakterien assoziiert an Makrophagen (%)		Überlebende Bakterien (%) bei Makrophagen	
	C3Hf	C57Bl/6	C3Hf	C57Bl/6
NS (homolog)	3,6 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 0,8	60 $\pm$ 6	105 $\pm$ 11
NS _a (homolog)	4,1 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,3	66 $\pm$ 3	105 $\pm$ 10
NS _a + AS (homolog)	2,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2	51 $\pm$ 6	98 $\pm$ 6
NS (heterolog)	2,8 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,4	57 $\pm$ 4	111 $\pm$ 8

Tab. 4: Einfluß der Opsonisierung von virulenten S.typhimurium SF1826 auf Bindung und Abtötung durch normale Makrophagen aus infektre-sistenten C3Hf- und infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen. Jeweils 10^6 Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $1 - 3 \times 10^5$ mit verschie-denen Normalseren (NS) und zum Teil mit Antiserum (AS) opsoni-sierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach wei-teren 30 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Mit NS_a sind Normalseren bezeichnet, die bei 0°C mit UV-getöteten S.typhimurium absorbiert waren. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SA von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert) angegeben.

Tab. 4, in der die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt sind, ist zu entnehmen, daß die Abtötung der virulenten S.typhimurium SF1826 durch die Makrophagen der beiden Mäusestämme unabhängig von der Art der Opsonisierung ist. Daraus ergibt sich, daß Antikörper offensicht-lich keinen Einfluß auf die Abtötung haben. Auch die Kapazität des Komple-

mentsystems und eventuell weiterer opsonisierender Serumkomponenten scheint in C3Hf- und C57Bl/6-Mäusen gleich zu sein. Diese Variation der Opsonisierungsbedingungen beeinflusst auch nicht die Assoziation der Bakterien an die Makrophagen der beiden Mäusestämme.

Analoge Untersuchungen mit Bakterien des avirulenten Stammes SF10223 und Makrophagen von sensitiven C57Bl/6-Mäusen zeigten ebenfalls keine Abhängigkeit der Abtötung von der Opsonisierung. Auch in der Assoziation von avirulenten und virulenten S.typhimurium an Makrophagen dieser sensitiven Mäuse konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Das steht im Gegensatz zu den Befunden von Jenkin (40,74) und Rowley (43). Diese Autoren haben berichtet, daß virulente Stämme von S.typhimurium erst nach Opsonisierung mit Antiserum im selben Maß wie avirulente aufgenommen, dann aber auch wie diese abgetötet wurden. Unsere Untersuchungen stimmen aber mit denen von Furness (38) überein, der mit den gleichen Bakterienstämmen, mit denen Jenkin (40,74) und Rowley (43) gearbeitet haben, zu dem Ergebnis gekommen war, daß virulenter und avirulenter Stamm von S.typhimurium gleich gut phagozytiert werden, es aber nur zu einer Abtötung des avirulenten Stammes kam, während sich der virulente vermehrte.

Für das hier untersuchte Infektionsmodell kann also festgestellt werden, daß eine deutliche Korrelation besteht zwischen der Resistenz der Tiere gegen S.typhimurium und der Fähigkeit der Makrophagen, diese Bakterien in vitro abzutöten. Dies ließ sich noch an einem weiteren Beispiel zeigen: Der für Mäuse apathogene E.coli F492 (LD_{50} größer als 10^7 Bakterien/Maus) wird, opsonisiert mit Normalserum, in vitro bereits nach 30 Minuten zu 76% durch normale C3Hf-Makrophagen abgetötet.

2.2. Versuche zur Gewinnung aktivierter Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen

Es war interessant zu erfahren, wie sich aktivierte Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen im Vergleich zu denen aus C3Hf-Mäusen verhalten, besonders bei Verwendung virulenter S.typhimurium SF1826. Bevor aber diese Fragestellung angegangen werden konnte, mußte das Problem der Gewinnung aktivierter Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen gelöst werden. Wir haben es zuerst mit der Infektion der Mäuse durch den apathogenen

E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142 versucht. Dafür sprachen folgende Gründe: a.) Bei der Aktivierung der Makrophagen der C3Hf-Mäuse hatte sich die intraperitoneale Injektion dieser Hybrid-Bakterien als vorteilhaft erwiesen (II.1.2.2.). b.) Für die infektsensitiven C57Bl/6-Mäuse schien uns gerade die Infektion der Tiere mit einem möglichst apathogenen Bakterium nötig.

2.2.1. Vergleich der Immunisierung von C57Bl/6- und C3Hf-Mäusen mit dem E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142

Der Keimzahlverlauf in der Milz nach intraperitonealer Injektion von 10^7 lebenden Hybrid-Bakterien in C57Bl/6-Mäusen ist nicht von dem in C3Hf-Mäusen zu unterscheiden (Abb. 12). Das Peritoneum bei C57Bl/6-Mäusen ist nach 6 Tagen (nicht dargestellt), bei C3Hf-Mäusen nach 4 Tagen keimfrei (Abb. 8).

Wir haben deshalb, wie bei C3Hf-Mäusen (siehe Abb. 8), im Verlauf der Infektion mit Hybrid-Bakterien die bakterizide Aktivität der Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen in vitro gegen S.typhimurium getestet. Dabei wurden beide Stämme von S.typhimurium eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Eine etwas erhöhte Abtötung war nur mit Bakterien des virulenten Stammes 5 Tage nach der Infektion zu beobachten. Dies war möglicherweise durch eine direkte Stimulierung der Makrophagen durch Endotoxin (40) infolge der hohen Infektionsdosis bedingt; denn zu diesem Zeitpunkt persistierten noch Impfkeime im Peritoneum. So muß festgestellt werden, daß die Infektion von C57Bl/6-Mäusen mit Hybrid-Bakterien F1142, trotz einer zeitlich gleichartigen Eliminierung dieser Keime wie bei C3Hf-Mäusen, nicht zu einer Aktivierung der Makrophagen führt.

Von einer eingehenderen Untersuchung dieses Phänomens erhofften wir weiteren Einblick in die Natur der Immunität gegen Mäusetypus zu erhalten. So haben wir geprüft, ob sich die Reaktion der beiden Mäusestämme nach Immunisierung mit F1142-Bakterien auch in der Antikörperantwort unterscheidet. Dazu haben wir den Bakterienagglutinationstiter der Seren mit S.typhimurium 40 Tage nach Immunisierung bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt ist der maximale Titer in der Regel erreicht (54,62). Der Antikörpertiter des Serums von C3Hf-Mäusen betrug 1:256, von C56Bl/6-Mäusen

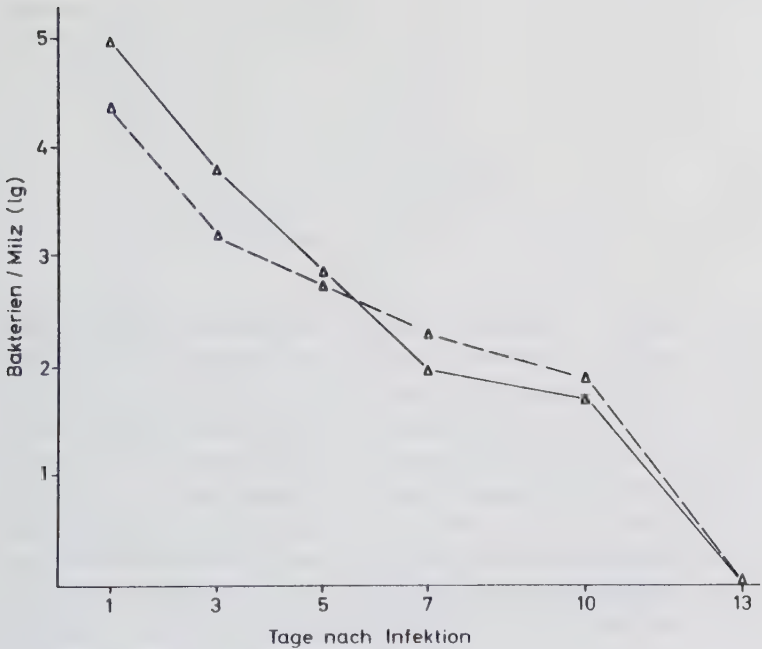


Abb. 12: Persistenz des E.coli-S.typhimurium-Hybrids F1142 in der Milz von C57Bl/6- (—) und C3Hf-Mäusen (---). Es wurden 10^7 lebende Bakterien i.p. injiziert. Für eine Bestimmung wurden je 3 Mäuse verwendet. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 2 Versuchen.

1:128. Die Seren von jeweils 3 Tieren waren vereinigt worden. Die humorale Antwort von C3Hf- und C57Bl/6-Mäusen scheint also gleich zu sein.

Damit war die Möglichkeit geboten, die Effektivität von humoraler und zellvermittelter Immunantwort bei Mäusetyphus zu überprüfen. Zu diesem Zweck haben wir jeweils 7 Mäuse von beiden Stämmen 10 und 40 Tage nach Immunisierung mit Hybrid F1142-Bakterien mit der 180-fachen

Tage nach Infektion	Überlebende Bakterien (%)	
	SF10223	SF1826
— ^a	64 ± 7	115 ± 9
5	71 ± 8	67 ± 3
7	69 ± 9	111 ± 7
10	58 ± 7	n.b.

Tab. 5: Abtötung von avirulenten (SF10223) und virulenten (SF1826) S.typhimurium durch Makrophagen aus infektssensitiven C57Bl/6-Mäusen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion mit E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142. Zur Aktivierung der Makrophagen wurden 10^7 lebende Hybrid-Bakterien i.p. injiziert. Jeweils 10^6 Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 2×10^5 mit Normalserum opsonisierte S.typhimurium zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach weiteren 30 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert) angegeben. a: Kontrolle mit Makrophagen aus nicht infizierten Tieren.
n.b. = nicht bestimmt.

LD_{50} des virulenten S.typhimurium SF1826 belastet. Ein Schutz der Tiere 10 Tage nach Immunisierung wäre auf die Anwesenheit aktivierter Makrophagen zurückzuführen, da die Antikörperbildung um diesen Zeitpunkt erst einsetzt (54,62). Nach 40 Tagen dagegen muß die Reaktion der C57Bl/6-Mäuse zeigen, welchen Schutz die humorale Immunantwort allein vermitteln kann.

Abb. 13 ist zu entnehmen, daß C3Hf-Mäuse sowohl 10 als auch 40 Tage nach Immunisierung mit Hybrid F1142-Bakterien geschützt sind. Bei C57Bl/6-Mäusen ist dagegen nur eine Verzögerung des Sterbens der Tiere zu beobachten, das nach 40 Tagen stärker ausgeprägt ist als nach 10 Tagen.

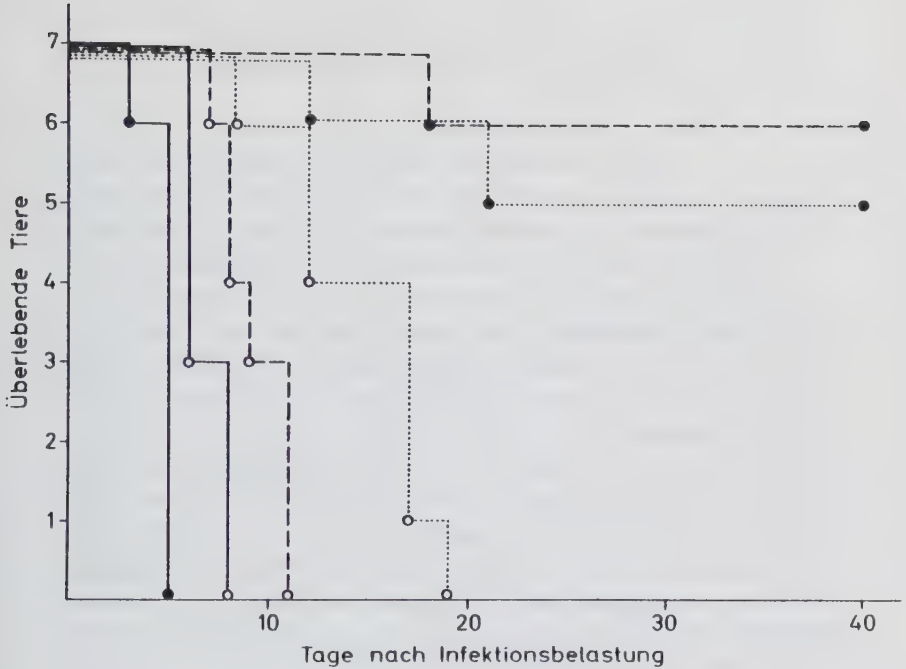


Abb. 13: Immunisierung und Infektionsbelastung von infekt sensitiven C57Bl/6-Mäusen (o) und resistenten C3Hf-Mäusen (●). Zur Immunisierung wurden 10^7 lebende E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142 i.p. injiziert. Die Belastung erfolgte mit 180 LD₅₀ des virulenten S.typhimurium SF1826 (i.p.) 10 (---) oder 40 (....) Tage nach Immunisierung und bei nicht immunisierten Kontrollen (—). Jeweils 7 Tiere wurden pro Gruppe eingesetzt.

Somit kann folgendes festgestellt werden: Obwohl nach Infektion mit Hybrid-Bakterien humorale Antikörper gegen S.typhimurium entstehen, sind die Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen zu keinem Zeitpunkt deutlich aktiviert. Das zeigt, zusammen mit der Infektuszeptibilität der immunisierten Tiere, deutlich die entscheidende Funktion der zellvermittelten Immunität bei der erworbenen Resistenz gegen Salmonellen.

2.2.2. Bakterizide Aktivität von Makrophagen aus *S.typhimurium* SF10223-infizierten C57Bl/6-Mäusen in Abhängigkeit des Infektionsverlaufs

Zur Gewinnung aktivierter Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen mußte daher wieder auf die Infektion der Tiere mit avirulenten *S.typhimurium* SF10223 zurückgegriffen werden. Es war bekannt, daß auch die infektempfindlichen C57Bl/6-Mäuse durch Immunisierung mit lebenden avirulenten *S.typhimurium* SF10223 geschützt werden können (54). Wir haben die Tiere mit 2×10^3 lebenden Bakterien intraperitoneal infiziert und den Keimzahlverlauf in Milz und Peritoneum bestimmt. Nachdem dieser das Maximum überschritten hatte, wurde die Abtötung von *S.typhimurium* SF10223 durch Makrophagen in vitro getestet.

Wie Abb. 14 zu entnehmen ist, nimmt erst nach dem 10.Tag die Bakterienzahl in Milz und Peritoneum ab. Bei C3Hf-Mäusen wurde dagegen das Maximum der Keimzahlen schon nach 7 Tagen erreicht (Abb. 7). Die vollständige Eliminierung der Bakterien aus dem Peritoneum ist gegenüber C3Hf-Mäusen ebenfalls etwas verzögert. Der deutlichste Unterschied gegenüber der Situation bei C3Hf-Mäusen besteht aber darin, daß bei C57Bl/6-Mäusen die Bakterienzahl in der Milz nur sehr langsam schwindet. Das läßt den Übergang in einen Carrier-Zustand vermuten, wie er bei Mäusetyphus häufig eintritt (19,75). Trotzdem läßt die ab dem 13. Tag beobachtete erhöhte Abtötung von *S.typhimurium* SF10223 durch die Makrophagen in vitro nach dem 28. Tag wieder nach. In den nachfolgenden Versuchen wurden aktivierte Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen 16 - 24 Tage nach der Infektion mit avirulenten *S.typhimurium* entnommen.

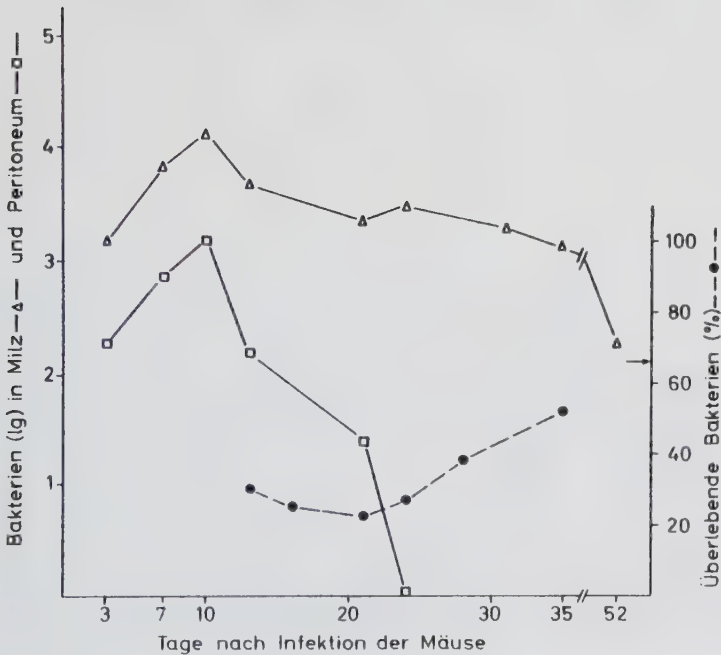


Abb. 14: Persistenz von avirulenten *S.typhimurium* SF10223 in Milz (Δ) und Peritoneum (□) von infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen und die bakterizide Aktivität der Makrophagen gegen *S.typhimurium* SF10223 *in vitro*. 2×10^3 lebende *S.typhimurium* SF10223 wurden i.p. injiziert. Die erhaltenen Keimzahlen (Kolonienbildung) pro Milz und Peritoneum sind Mittelwerte aus 3 Mäusen. Zur Bestimmung der bakteriziden Aktivität der Makrophagen wurden jeweils 10^6 Peritonealzellen in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $1 - 3 \times 10^5$ mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach weiteren 30 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien (●) durch Plattieren bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte von 6 Bestimmungen (Triplikate, doppelt plattiert) angegeben. Der Pfeil gibt die Abtötung der Bakterien durch normale Makrophagen an.

2.3. Vergleich der bakteriziden Kapazität aktivierter Makrophagen

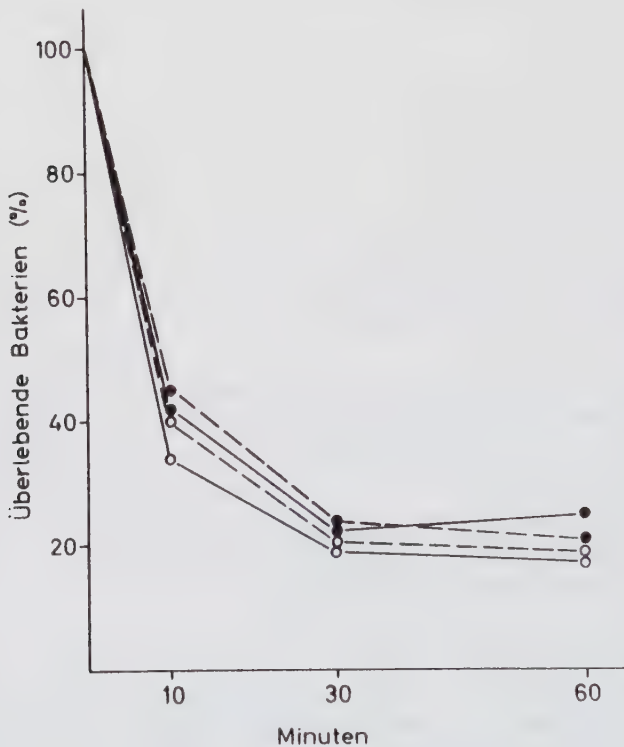


Abb. 15: Abtötung von avirulenten S.typhimurium SF10223 (o) und virulenten S.typhimurium SF1826 (●) durch aktivierte Makrophagen von infektresistenten C3Hf-Mäusen (—) und infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen (---). Die Aktivierung der Makrophagen erfolgte durch i.p. Infektion der Mäuse mit 2×10^3 lebenden S.typhimurium SF10223. Jeweils 10^6 Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $1,5 \times 10^5$ mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen

assoziierten Bakterien und zu den weiteren angegebenen Zeiten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. Der Anteil der Makrophagen-assoziierten avirulenten bzw. virulenten Bakterien ergab sich bei C3Hf-Makrophagen zu 2,9% bzw. 3,3% und bei C57Bl/6-Makrophagen zu 3,4% bzw. 3,2%. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 2 getrennten Versuchen.

Die vergleichenden Untersuchungen von aktivierten Makrophagen aus C3Hf- und C57Bl/6-Mäusen wurden mit S.typhimurium SF10223 und SF1826 durchgeführt, die mit Normalserum opsonisiert waren. Wie Abb. 15 zeigt, ist kein Unterschied in Kinetik und Ausmaß der Abtötung der beiden Bakterienstämme durch die verschiedenen aktivierten Makrophagen festzustellen. Auch in der Assoziation der Bakterien an die Makrophagen treten keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Legende zu Abb. 15). Diese Ergebnisse erfahren keine Veränderung, wenn die Bakterien noch zusätzlich mit homologem Antiserum opsonisiert werden. Somit gilt der in Abschnitt II. 1.3.3. für den Einfluß der Opsonisierung auf die Bindung und Abtötung von S.typhimurium SF10223 durch C3Hf-Makrophagen festgestellte Tatbestand für das gesamte Infektionsmodell.

Im Zuge einer durch zellvermittelte Immunität erworbenen Resistenz (16) werden auch die Makrophagen der infektsensitiven C57Bl/6-Mäuse auf ein Aktivitätsniveau gebracht, das sie befähigt, virulente Salmonellen abzutöten. In vivo zeigt sich das im Überleben der Tiere bei einer Belastung mit mindestens der 100-fachen LD_{50} des virulenten Bakterienstammes.

2.4. Über die Verwendung von Knochenmarkmakrophagen zur Abtötung von S.typhimurium

Unter Knochenmarkmakrophagen versteht man Makrophagen, die sich in vitro unter bestimmten Kulturbedingungen ungefähr innerhalb einer Woche aus Stammzellen des Knochenmarks entwickeln (76). Die Vorteile der Gewinnung von Makrophagen auf diese Weise bestehen darin, daß eine homogene Zellpopulation in großer Ausbeute pro Tier erhalten werden kann. Bei Mäusen sind es ca. 10^8 Knochenmarkmakrophagen gegenüber

Makrophagen	Überlebende Bakterien (%)	
	SF 10223	SF 1826
normale Knochenmarkmakrophagen	71 (3)	137 (2)
normale Peritonealmakrophagen	66 (3)	112 (2)
aktivierte Knochenmarkmakrophagen	23 (3)	n.b.
aktivierte Peritonealmakrophagen	26 (3)	n.b.

Tab. 6: Abtötung von avirulenten (SF10223) und virulenten (SF1826) S.typhimurium durch normale und aktivierte Knochenmarkmakrophagen und Peritonealmakrophagen von infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen. Die Aktivierung der Peritonealmakrophagen erfolgte durch i.p. Injektion von 2×10^3 lebenden S.typhimurium SF10223. Jeweils 10^6 Peritonealzellen oder 3×10^5 Knochenmarkmakrophagen wurden in Petrischalen eingesät. Knochenmarkmakrophagen wurden zur Aktivierung 24 Stunden vor Zugabe der Bakterien 50 µl eines MCF-haltigen Überstands pro 2 ml Medium zugesetzt. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $1 - 3 \times 10^5$ mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach weiteren 30 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt (Triplikate, doppelt plattiert). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte von 2 bzw. 3 getrennten Versuchen. n.b. = nicht bestimmt.

nur ca. 10^6 Peritonealmakrophagen pro Tier. Das kann zum Beispiel für zukünftige biochemische Untersuchungen an Makrophagen von großem Nutzen sein. Zunächst muß aber die Frage geklärt werden, ob diese in vitro gereiften Makrophagen genau so bakterizid sind wie peritoneale Makrophagen.

Zu diesem Zweck haben wir 3×10^5 Knochenmarkmakrophagen, die sich innerhalb 7-tägiger Kultivierung aus Stammzellen von C57Bl/6-Mäusen entwickelt hatten und sich in diesem Stadium noch leicht von der Oberfläche der Kulturgefäße ablösen lassen, wie Peritonealzellen in Petrischalen eingesät. (3×10^5 Zellen ergeben eine Rasendichte adhärierender Makrophagen, die der von 10^6 Peritonealzellen vergleichbar ist). Nach 24 Stunden Inkubation wurde die bakterizide Kapazität dieser Makrophagen getestet, wobei wie mit Peritonealmakrophagen verfahren wurde. Da sich die Abtötungskinetik nicht wesentlich von jener peritonealer Makrophagen unterschied, wurde in allen Fällen der Anteil der an Makrophagen assoziierten überlebenden Bakterien nach 30 Minuten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 dargestellt.

Normale Knochenmarkmakrophagen verhalten sie wie normale Peritonealmakrophagen aus diesen Mäusen. Sie können auch nur avirulente S.typhimurium SF 10223 abtöten.

Zur Aktivierung von Knochenmarkmakrophagen war es nötig, eine in vitro Methode zu verwenden. Wir haben dazu folgende Möglichkeit genutzt. Knochenmarkmakrophagen werden seit mehreren Jahren in vitro als Effektorzellen in der Zytotoxizität gegen Tumorzellen eingesetzt (77). Ihre Aktivierung, gemessen im zytotoxischen Test, gelang mit einem Lymphokin, das Makrophagen zytotoxischer Faktor (MCF) genannt wird (78). Dieser Mediator wird von sensibilisierten T-Zellen nach immunologisch spezifischer Stimulierung mit Tumorzellen in vitro in den Überstand abgegeben. Es war also zu prüfen, ob mit Hilfe dieses Mediators unter Bedingungen, bei denen eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität der Knochenmarkmakrophagen erfolgt, auch eine erhöhte bakterizide Aktivität dieser Makrophagen erreicht wird. Dazu haben wir, analog den Bedingungen wie sie von der Arbeitsgruppe von Lohmann-Matthes zur Aktivierung der Knochenmarkmakrophagen im zytotoxischen Test verwendet werden, zu jeweils 3×10^5 Knochenmarkmakrophagen 50 μ l eines MCF-haltigen Überstands gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die bakterizide Kapazität der Makrophagen bestimmt. Wie ebenfalls Tab. 6 zu entnehmen ist, tritt nach Inkubation der Knochenmarkmakrophagen mit MCF auch eine Steigerung der bakteriziden Aktivität gegen S.typhimurium ein. Sie ist der durch in vivo aktivierten Peritonealmakrophagen aus infizierten Mäusen vergleichbar. Dies bestätigt

auch die Unspezifität aktivierter Makrophagen hinsichtlich ihrer Effektorleistungen, die in ähnlichem Zusammenhang auch von anderen Autoren (79) bereits beschrieben worden ist.

Eine gewisse Problematik der Verwendung von Knochenmarkmakrophagen im bakteriziden Test besteht aber zur Zeit noch darin, daß der Reifungsprozeß der Makrophagen noch nicht genügend standardisiert werden konnte. Die Differenzierung der Zellen stoppt in vitro nicht auf der Stufe normaler Makrophagen, sondern läuft oft zur Bildung aktivierter Makrophagen weiter. Dadurch ist die reproduzierbare Gewinnung naiver Makrophagen noch nicht sichergestellt.

3. Versuche zur Lokalisierung der Abtötung von S.typhimurium durch Peritonealmakrophagen

Die bisherigen Untersuchungen, die über die Abtötung von Salmonellen durch Makrophagen aus der Literatur bekannt sind, haben sich kaum experimentell mit dem Problem der Lokalisierung dieser Prozesse beschäftigt. Im allgemeinen wird die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien auch gleich als der Anteil der phagozytierten betrachtet und die Abtötung als intrazellulär bezeichnet. Diese Frage soll für das hier beschriebene System mittels funktioneller Tests geklärt werden. Dabei wurden Funktionstests den häufig verwendeten optischen Methoden vorgezogen, die wohl eine genaue Ortsbestimmung, aber keine Aussage über Abtötung zulassen. Bei der in unserem System verwendeten niedrigen Infektionsrate wären mikroskopische Nachweistechiken allgemein schwierig.

3.1. Untersuchung der Überstände von Makrophagenkulturen auf bakterizide Aktivität

Ruhende normale Makrophagen sekretieren auch in vitro kontinuierlich Lysozym (80) und saure lysosomale Hydrolasen, wie z.B. β -Glukuronidase, Mannosidasen und Phosphatasen (81). Während der Phagozytose kann diese Ausscheidung erhöht sein (82,83). Bei Alveolarmakrophagen wird eine extra-

zelluläre Abtötung von Bakterien unter Beteiligung von Lysozym als ein Abwehrmechanismus gegen bakterielle Infektionen diskutiert (82). Weiterhin wurde von zwei Arbeitsgruppen (84,85) berichtet, daß immunologisch aktivierte Meerschweinchen-Makrophagen in Kultur ein oder mehrere lösliche Produkte in den Überstand abgeben, die auch eine extrazelluläre Abtötung von Listeria monocytogenes herbeiführen können. Dieses Bakterium ist, wie S.typhimurium, ein fakultativ intrazellulärer Parasit, gegen den zellvermittelte Immunität mit intrazellulärer Abtötung durch Makrophagen entwickelt wird (86). Deshalb haben wir auch bei dem von uns untersuchten System überprüft, ob in Überständen von Makrophagenkulturen bakterizide Aktivität gegen S.typhimurium auftritt. Von dieser müßte man annehmen, daß sie auch Bakterien schädigen würde, die nur an der Oberfläche von Makrophagen haften.

Wir verwendeten für diese Untersuchungen Makrophagen aus normalen Mäusen und aus solchen, die mit dem E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142 infiziert waren. Nach einer Kultivierungszeit der Makrophagen von 6 Stunden ohne Antibiotika wurden Bakterien zugegeben und, wie in den vorangegangenen Versuchen, die Abtötung der an Makrophagen assoziierten Bakterien bestimmt. Außerdem wurden Überstände dieser Makrophagenkulturen (Bicarbonat-freies Medium) vor Zugabe der Bakterien und zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe von Bakterien gesammelt, eventuell vorhandene Makrophagen durch Zentrifugieren entfernt und die zellfreien Überstände mit S.typhimurium SF10223 beimpft. Nach 30 Minuten bei 37°C wurde die Zahl der überlebenden Bakterien bestimmt. Da in allen 4 Kontrollansätzen die Zahl der lebenden Bakterien um ca. 20% abgenommen hatte, wahrscheinlich durch Anhaften der Bakterien an die Gefäßwand, wurde der Anteil der nach 30 Minuten in den Teströhrchen noch vorhandenen Bakterien auf den 30 Minuten-Wert der Kontrollen als 100% bezogen. Zur Kontrolle wurden die Bakterien mit reinem, unverbrauchtem Zellkulturmedium inkubiert (Tab. 7).

In Überständen von normalen und aktivierten Makrophagen ist weder vor noch nach Zugabe von Bakterien eine extrazelluläre Abtötung von S.typhimurium SF10223 nachweisbar. An diese Makrophagen assoziierte Bakterien werden aber abgetötet (siehe Tab. 7, Zahlen in Klammern).

Gewinnung der Überstände von Makrophagen nach Inkubation mit anhaftenden Bakterien (Min.)	Überlebende Bakterien (%) nach Inkubation mit Überständen von Makrophagen	
	normal	aktiviert
0 ^a	104 ± 9	106 ± 11
7,5 ^b	n.b.	108 ± 21 (70)
15 ^b	104 ± 16 (91)	n.b.
30 ^b	144 ± 19 (66)	106 ± 9 (33)

Tab. 7: Test auf Abtötung von S.typhimurium SF10223 in Zellkulturüberständen von normalen und aktivierten Makrophagen vor und nach Zugabe von S.typhimurium SF10223. Jeweils 10^6 Peritonealzellen von normalen oder mit E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142 infizierten C3Hf-Mäusen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 6 Stunden ohne Antibiotika wurden a.) die Überstände vor Zugabe von Bakterien genommen, b.) nach Zugabe von 8×10^5 Bakterien und einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden nicht an Makrophagen haftende Bakterien abgewaschen und zu den angegebenen Inkubationszeiten die Überstände gewonnen. Alle Überstände wurden jeweils mit 10^3 Bakterien/ml beimpft, die Zahl der überlebenden Bakterien nach 30 Minuten Inkubation durch Plattieren bestimmt und auf die Kontrollen mit reinem Medium als 100% bezogen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SA von 4 Bestimmungen. Die Zahlen in Klammern geben den Anteil der überlebenden Makrophagen-assoziierten Bakterien (%) (siehe V.7.1.3.) zu den angeführten Zeiten an.
n.b. = nicht bestimmt.

3.2. Einfluß von Cytochalasin B und 2-Desoxy-D-glukose auf die Abtötung von Bakterien durch Makrophagen

Die fehlende bakterizide Aktivität in Überständen von Makrophagen, wie sie in Abschnitt II.3.1. beschrieben wurde, schließt eine extrazelluläre Tötung von Bakterien, die nur an Makrophagen haften, noch nicht aus. Wir haben deshalb zu klären versucht, ob die Abtötung von Bakterien bereits nach Bindung an die Plasmamembran der Makrophagen erfolgt oder ob Internalisierung der Bakterien Voraussetzung für deren Abtötung durch Makrophagen ist.

Um diese Problematik experimentell anzugehen, haben wir die Eigenschaften folgender Agentien ausgenutzt. Cytochalasin B stoppt Phagozytose durch Interaktion mit den Mikrofilamenten (Depolymerisierung) der Makrophagen (87,88). 2-Desoxy-D-glukose hemmt - über einen von Cytochalasin B wahrscheinlich verschiedenen Mechanismus (89) - nur die Phagozytose opsonisierter Partikel über die Fc- und C3-Rezeptoren der Makrophagen, ohne aber die Aufnahme nicht opsonisierter Partikel zu beeinflussen (90). Beide Agentien haben keinen Einfluß auf die Anlagerung von Partikeln an Makrophagen. Sie stellen somit günstige Hilfsmittel dar, um Bakterien an Makrophagen anhaften zu lassen, ihre Internalisierung aber zu verhindern. Wir haben daher die bakterizide Wirkung von C3Hf-Makrophagen auf S.typhimurium SF10223 in Anwesenheit von Cytochalasin B (1 µg/ml) oder von 2-Desoxyglukose (50 mM) untersucht.

Wie in Tab. 8 dargestellt, blockiert Cytochalasin B sowohl bei normalen als auch bei aktivierten Makrophagen die Abtötung vollkommen. Dieser Effekt ist nicht auf eine Schädigung der Makrophagen zurückzuführen, wie sich aus Untersuchungen von Allison et al. (87,91) schließen läßt. Der Einsatz von Cytochalasin B, wie er in Abschnitt II.3.3. beschrieben wird, bestätigt dies. 2-Desoxyglukose hemmt nur die Abtötung opsonisierter Bakterien. Nicht opsonisierte Bakterien werden dagegen unverändert abgetötet. Ein Wachstumsvergleich der Bakterien in Zellkulturmedium zeigte zumindest in einer Stunde keinen schädigenden Effekt dieser Verbindung.

Versuche mit C57Bl/6-Makrophagen führten zu ähnlichen Ergebnissen. Somit kann festgestellt werden, daß für die Abtötung, wie sie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben worden ist, die Internalisierung der Bakterien eine wesentliche Voraussetzung darstellt.

Makrophagen	Bakterien opsonisiert mit	Hemmung der Abtötung (%) ^a mit	
		Cytochalasin B	2-Desoxyglukose
normal	NS + AS	94 $\pm$ 8	64 $\pm$ 7
	—	95 $\pm$ 13	2 $\pm$ 3
aktiviert	NS + AS	109 $\pm$ 9	n.b.

Tab. 8: Einfluß von Cytochalasin B und 2-Desoxy-D-glukose auf die Abtötung von S.typhimurium SF10223 durch normale und aktivierte Makrophagen aus C3Hf-Mäusen. Jeweils 10^6 Peritonealzellen aus normalen oder mit S.typhimurium SF10223 infizierten Mäusen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden vor Zugabe von 10^6 nicht opsonisierten oder 2×10^5 mit Normalserum (NS) und Antiserum (AS) opsonisierten Bakterien Cytochalasin B (1 μ g/ml) oder 2-Desoxyglukose (50 mM) zugesetzt. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach weiteren 30 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien durch Plattieren bestimmt. a: Die Ergebnisse sind dargestellt als Hemmung der Abtötung (%) gegenüber unbehandelten Kontrollen (Mittelwerte $\pm$ SA von 6 Bestimmungen). n.b. = nicht bestimmt.

3.3. Bakterizide Aktivität der Makrophagen in Abhängigkeit von der Cytochalasin B-Zugabe und der Opsonisierung der Bakterien

Wir wollten prüfen, ob die Opsonisierung der Bakterien vor allem mit Antikörpern einen Einfluß auf ihre Internalisierung durch Makrophagen hat. Folgende Sachverhalte legten uns diese Versuche nahe. Wie schon in Tab. 3 gezeigt wurde, erhöht sowohl die Opsonisierung mit Antiserum als auch mit Normalserum die Assoziation der Bakterien an Makrophagen.

Dabei binden Antikörper über ihr Fc-Stück an den Fc-Rezeptor und die C3b-Komponente des Komplementsystems an den C-Rezeptor der Makrophagen (92). Umfangreiche Untersuchungen über die Phagozytose von Erythrozyten haben aber ergeben, daß bei normalen Makrophagen ein funktioneller Unterschied dieser Rezeptoren besteht: Während der C-Rezeptor vorwiegend die Bindung von Partikeln vermittelt, wird bei Bindung über IgG-Antikörper an den Fc-Rezeptor ein Signal zur Internalisierung gegeben (93,94,95). Somit stellte sich die Frage, ob in dem von uns untersuchten System Bakterien-gebundene Antikörper eine ähnliche Funktion bei der Internalisierung der Makrophagen ausüben.

Da Cytochalasin B, im Gegensatz zu 2-Desoxyglukose, praktisch unmittelbar nach Zugabe seine Wirkung entfaltet (87 und Abschnitt II.7.2.5.) wurde die Abhängigkeit der Bakterientötung von der Internalisierung durch Einwirkung von Cytochalasin B zu verschiedenen Zeiten nach Bakterienzugabe untersucht. Dies geschah sowohl mit Bakterien, die nur mit Normalserum (Komplement) als auch mit solchen, die mit Normalserum und Antiserum (Komplement und Antikörper) opsonisiert waren. In allen Versuchen wurde die Abtötung durch Makrophagen nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten gemessen. Das Ergebnis ist in Abb. 16 wiedergegeben.

Ist Cytochalasin B bereits bei Zugabe von Bakterien anwesend, so tritt eine totale Hemmung der Bakterientötung ein. Erfolgt die Zugabe von Cytochalasin B nach der Bakterienzugabe und dem Abwaschen nicht haftender Bakterien, so ist bei Bakterien, die mit Normalserum und Antiserum opsonisiert waren, bereits die volle Abtötung, wie bei Kontrollen ohne Cytochalasin B Zugabe, zu beobachten. Man muß daher annehmen, daß zu diesem Zeitpunkt die Internalisierung schon erfolgt ist. Bei Bakterien, welche nur mit Normalserum opsonisiert waren, ist dagegen keine Abtötung festzustellen; die Bakterien sind wahrscheinlich noch nicht phagozytiert. Erst wenn die Makrophagen mit den anhaftenden Bakterien noch weitere 5 Minuten bis zur Zugabe von Cytochalasin B inkubiert werden, erfolgt Abtötung unabhängig von der Art der Opsonisierung. Dieses Resultat spricht für eine beschleunigte Internalisierung von S.typhimurium durch normale Makrophagen infolge einer zusätzlichen Opsonisierung mit IgG-Antikörpern.

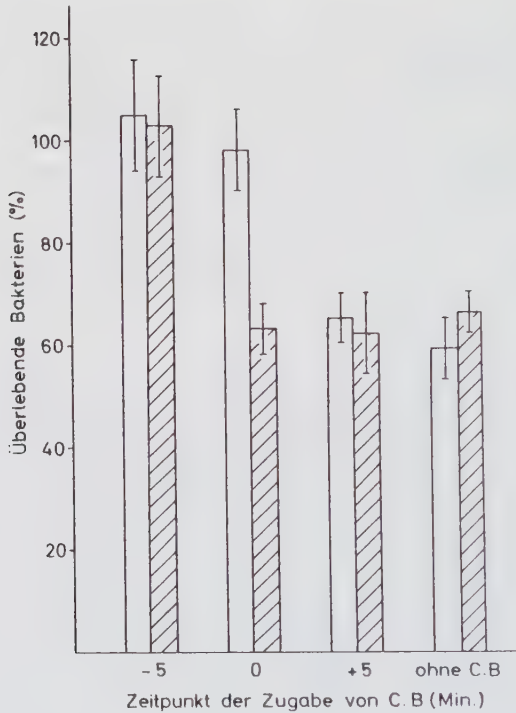


Abb. 16: Einfluß von Cytochalasin B auf die Abtötung von verschiedenen opsonisierten S.typhimurium SF10223 durch normale C3Hf-Makrophagen zu verschiedenen Zeiten nach Bakterienzugabe. Jeweils 10^6 Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 10^5 mit Normalserum (offene Säulen) oder mit Normalserum und Antiserum (schraffierte Säulen) opsonisierte Bakterien zugegeben (Zeitpunkt -5). Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und nach weiteren 30 Minuten der Anteil der davon überlebenden Bakterien bestimmt. Die Zugabe von Cytochalasin B ($1 \mu\text{g/ml}$) erfolgte zu den angegebenen Zeiten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SA aus 3 - 4 getrennten Versuchen.

4. Versuche zur Abtötung radioaktiv markierter Bakterien durch normale Peritonealmakrophagen

In den bisherigen Untersuchungen war mehrfach die Beobachtung gemacht worden, daß die Anzahl der Makrophagen-assoziierten lebenden Bakterien nach Opsonisierung mit Normalserum und Antiserum niedriger war, als nach Opsonisierung nur mit Normalserum (Tab. 3 und 4). Als Folge der im vorangehenden Abschnitt II.3.3. beschriebenen beschleunigten Internalisierung von Bakterien, die mit IgG-Antikörpern opsonisiert waren, wäre eine früh einsetzende Abtötung der Bakterien denkbar. Um zwischen einer reduzierten Assoziation der Bakterien, die zusätzlich mit Antiserum opsonisiert sind, an Makrophagen und einer frühen Abtötung zu unterscheiden, wurden Experimente mit radioaktiv markierten Bakterien durchgeführt. Sie ermöglichen eine Bestimmung aller Makrophagen-assoziierten Bakterien, da die Radioaktivität lebender und bereits getöteter Bakterien gleichermaßen erfaßt wird. Damit kann in einem Experiment zu einem einzigen Zeitpunkt sowohl Bindung als auch Abtötung von Bakterien durch Phagozyten bestimmt werden.

4.1. Einfluß der Opsonisierung mit Antiserum auf die Assoziation und Abtötung radioaktiv markierter Bakterien durch Makrophagen

Diese Experimente wurden auf die Extrem-Kombination von resistenten C3Hf-Makrophagen und avirulenten S.typhimurium SF10223 bzw. von sensitiven C57Bl/6-Makrophagen und virulenten S.typhimurium-SF1826 beschränkt. Die Versuche wurden, wie in V.7.3. beschrieben, mit ³H-Thymidin markierten Bakterien durchgeführt. Dabei wurde die Veränderung der spezifischen Aktivität, die sich durch den Quotienten von lebenden Bakterien (Kolonienzahl)/Gesamtzahl (cpm) ergibt, während der Inkubation der Bakterien mit Makrophagen verfolgt. Die spezifische Aktivität der Bakterien vor Zugabe zu den Makrophagen ist in den nachfolgenden Darstellungen gleich 1 bzw. 100% gesetzt.

Die Assoziation der Bakterien an Makrophagen, gemessen durch Lebzellzahlbestimmung und Radioaktivitätsmessung, ist in Tab. 9 zusammengefaßt.

Makrophagen/ Bakterien- Kombination	Bakterien opsonisiert mit	Makrophagen-assoziierte Bakterien (%)		Überlebende Bakterien(%)
		lebend	total (cpm)	
C3Hf / SF 10223	NS	3,5 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 1,4	66 $\pm$ 6
	NS + AS	1,5 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 1,0	36 $\pm$ 7
C57Bl/6 / SF 1826	NS	3,9 $\pm$ 0,4	6,4 $\pm$ 1,0	61 $\pm$ 10
	NS+AS	2,7 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 2,4	52 $\pm$ 13

Tab. 9: Assoziation von S.typhimurium an normale Makrophagen nach Lebendzellzahlbestimmung und Radioaktivitätsmessung (cpm) in Abhängigkeit von der Opsonisierung mit Normalserum (NS) oder mit Normalserum und Antiserum (AS). Es wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Peritonealzellen in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden wurden die Makrophagen 5 Minuten mit $1 - 2 \times 10^6$ radioaktiv markierten Bakterien inkubiert. Die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien wurde durch Plattieren und Radioaktivitätsmessung bestimmt. Der Anteil der überlebenden Bakterien (%) ist dargestellt als überlebende Bakterien (Kolonienzahl)/Gesamtzahl (cpm). Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwerte $\pm$ SA aus 3 Versuchen.

Nimmt man die Radioaktivitätsmessung als Angabe für die Gesamtzahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien und vergleicht sie mit der Zahl der lebenden gebundenen Bakterien zum Zeitpunkt 0 der bisherigen Experimente, so ergibt sich bei Bakterien, die nur mit Normalserum opsonisiert sind, folgendes (Tab. 9):

- Ca. 35% der avirulenten Bakterien, gebunden an Makrophagen aus infektsensitiven C3Hf-Mäusen, sind zum Zeitpunkt 0 (Abwaschen freier Bakterien) bereits abgetötet.
- Makrophagen aus infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen, die nach den bisherigen Untersuchungen virulente Bakterien nicht abtöten konnten, zeigen eine frühe Abtötung innerhalb der ersten 5 Minuten. Sie hat das gleiche

Ausmaß wie die von avirulenten S.typhimurium durch Makrophagen aus infektresistenten C3Hf-Mäusen.

Um auszuschließen, daß die beobachtete Reduktion der Lebendzellzahl durch eine Verklumpung der Bakterien an Makrophagenbruchstücke im Lysat bedingt ist, wurden Makrophagenlysate 2 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. Durch eine solche Beschallung werden Bakterienaggregate aufgelöst und Bakterien von Membranen entfernt. Wir konnten dabei keinen Anstieg in der Zahl der lebenden Bakterien feststellen. Eine Abnahme der Lebendzellzahl durch Aggregation der Bakterien ist somit nicht wahrscheinlich und es muß eine Abtötung der Bakterien angenommen werden.

Zusätzliche Opsonisierung der Bakterien mit Antiserum reduzierte in beiden untersuchten Kombinationen (Tab. 9) die Zahl der an Makrophagen adhätierenden Bakterien um ca. 20%. Betrachtet man jedoch den Anteil der lebenden Bakterien, so stellt man fest, daß, verglichen mit Bakterien, die nur mit Normalserum behandelt waren, die Abtötung avirulenter Bakterien durch C3Hf-Makrophagen beinahe verdoppelt ist. Dieser Effekt ist bei der Abtötung virulenter Bakterien durch C57Bl/6-Makrophagen nicht so stark ausgeprägt. Die Abnahme der Zahl Makrophagen-assoziiierter lebender Bakterien nach zusätzlicher Opsonisierung mit Antikörpern, die bei der Kombination von avirulenten S.typhimurium und C3Hf-Makrophagen besonders auffällt, ist damit vorwiegend auf eine erhöhte Abtötung in den ersten 5 Minuten nach Zugabe zu Makrophagen zurückzuführen.

Werden an Makrophagen assoziierte radioaktiv markierte Bakterien zur intrazellulären Abtötung weiterinkubiert, so bleibt die Radioaktivität konstant. Sie betrug z.B. mit C3Hf-Makrophagen und opsonisierten avirulenten S.typhimurium zum Zeitpunkt null 295 ± 34 cpm und nach 30 Minuten 308 ± 17 cpm pro Petrischale (Mittelwerte $\pm$ SA von 6 Ansätzen). Die zum Zeitpunkt 0 gemessene Aktivität kann also als Maß der insgesamt an Makrophagen assoziierten Bakterien auch für die nachfolgenden Inkubationszeiten zugrunde gelegt werden. Drückt man die Gesamtzahl der Makrophagen-assoziierten Bakterien durch deren Radioaktivität aus, so ergibt sich für die gesamte Abtötungskinetik das in Abb. 17 dargestellte Bild.

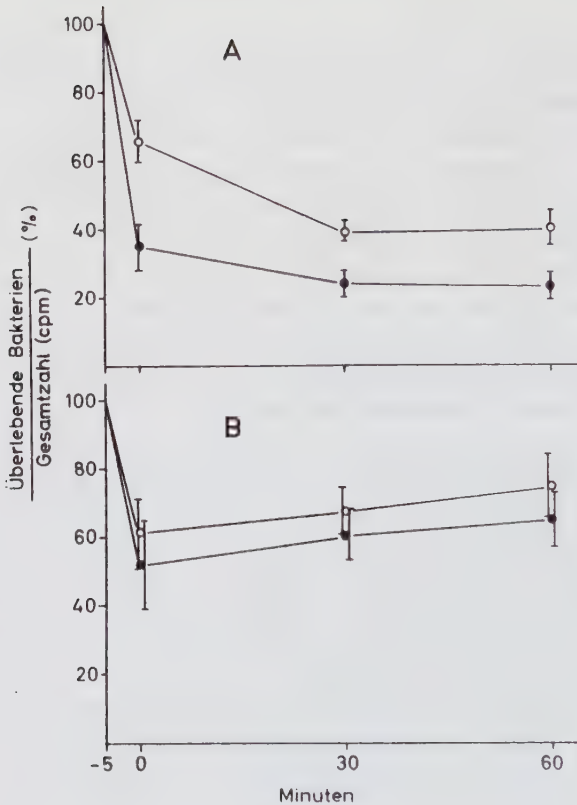


Abb. 17: Abtötung von avirulenten *S. typhimurium* SF10223 durch Makrophagen aus infektoresistenten C3Hf-Mäusen (A) und von virulenten *S. typhimurium* SF1826 durch Makrophagen aus infekt sensitiven C57Bl/6-Mäusen (B) bezogen auf die Gesamtzahl der Makrophagen-assoziierten Bakterien (cpm) in Abhängigkeit von der Opsonisierung. Jeweils $1,5 \times 10^6$ Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $1 - 2 \times 10^6$ mit Normalserum (o) oder mit Normalserum und Antiserum (●) opsonisierte radioaktiv markierte Bakterien zugegeben (Zeitpunkt -5). Zu den weiteren angegebenen Zeiten wurde die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien durch Plattieren und Radioaktivitätsmessung bestimmt. Es ist der Anteil der überlebenden Bakterien (Kolonienzahl)/Gesamtzahl (cpm) angegeben (Mittelwerte $\pm$ SA aus 3 Versuchen).

Dabei wird deutlich, daß die Opsonisierung von avirulenten S.typhimurium SF10223 mit Normalserum und Antiserum auch eine Erhöhung der maximalen Abtötung nach 30 Minuten durch C3Hf-Makrophagen mit sich bringt, verglichen mit Bakterien, die nur mit Normalserum opsonisiert waren. In den vorangegangenen Versuchen konnte dies nicht zum Ausdruck kommen, da die frühe Abtötung nicht erfaßt worden war. Ein ähnlich deutlicher Einfluß der zusätzlichen Opsonisierung mit Antiserum ist bei der Abtötung der virulenten S.typhimurium SF1826 durch C57Bl/6-Makrophagen nicht zu beobachten. Außerdem tritt, unabhängig von der Opsonisierung, trotz der frühen Abtötung der Bakterien bei weiterer Inkubation eine Vermehrung ein.

Auf Grund dieser Ergebnisse nehmen wir an, daß die Abtötung von S.typhimurium durch Mäuse-Makrophagen in zwei Phasen verläuft. Einer frühen schnellen Abtötung, die möglicherweise schon an der Membran erfolgt, schließt sich eine langsamere intrazelluläre Abtötung an. Makrophagen von infektsensitiven und -resistenten Mäusen unterscheiden sich dabei nur bezüglich der zweiten Stufe. Die frühe Abtötung der Bakterien scheint unabhängig von deren Virulenz zu erfolgen. Somit kann die Korrelation zwischen der Suszeptibilität der Mäuse und der bakteriziden Fähigkeit der Makrophagen dahingehend konkretisiert werden, daß die natürliche Resistenz der Tiere in der intrazellulären Abtötung der Salmonellen zum Ausdruck kommt.

4.2. Einfluß von Cytochalasin B auf die Abtötung von radioaktiv markierten S.typhimurium durch Makrophagen

Aus den Versuchen in Abschnitt II.3.2. geht hervor, daß Cytochalasin B die zweite, nämlich die intrazelluläre Phase der Abtötung blockieren kann. Als Mechanismus dafür wird eine Hemmung der Internalisierung angenommen (87). Es müßte also die Möglichkeit bestehen, bakterizides Geschehen an der Membran, welches wir in der ersten Stufe der Abtötung vermuteten, von intrazellulären Prozessen zu differenzieren. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von Cytochalasin B auf die Abtötung avirulenter radioaktiver S.typhimurium SF10223 durch C3Hf-Makrophagen geprüft. Das Ergebnis ist in Tab. 10 wiedergegeben.

Cytochalasin B-Zugabe	Überlebende Bakterien (%) ^a zum Zeitpunkt (Min.)	
	0	30
nein	64	37
ja	67	70

Tab. 10: Einfluß von Cytochalasin B auf die Abtötung von avirulenten S.typhimurium SF10223 durch Makrophagen aus C3Hf-Mäusen bezogen auf die Gesamtzahl der Makrophagen-assoziierten Bakterien (cpm). Jeweils $1,5 \times 10^6$ Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 10^6 mit Normalserum opsonisierte radioaktiv markierte Bakterien zugegeben, nachdem vorher Cytochalasin B (1 µg/ml) zugesetzt worden war. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden freie Bakterien abgewaschen. Zu diesem Zeitpunkt 0 und nach weiteren 30 Minuten Inkubation wurde die Zahl der Makrophagen-assoziierten Bakterien durch Plattieren und Radioaktivitätsmessung bestimmt. a: Der Anteil der überlebenden Bakterien ist angegeben als lebende Bakterien (Kolonienzahl)/Gesamtzahl (cpm).

Es ist ersichtlich, daß im Gegensatz zur intrazellulären Abtötung die frühe Abtötung von Bakterien, die mit Normalserum opsonisiert sind, durch Cytochalasin B nicht gehemmt wird. Das bestätigt die zweiphasige Abtötung von S.typhimurium durch Makrophagen und erhärtet die Wahrscheinlichkeit, daß die erste Phase (frühe Abtötung) bereits an der Plasmamembran der Makrophagen stattfindet.

Die Tatsache, daß die Zahl der lebenden Makrophagen-assoziierten Bakterien in Gegenwart von Cytochalasin B auch bei einer Weiterinkubation konstant bleibt, deutet auf eine Limitierung der frühen Abtötung hin, über deren Gründe bisher jedoch nur spekuliert werden kann. So wäre eine Heterogenität der Bakterienpopulation denkbar, wobei nur ein Teil der zugegebenen Bakterien für diese Prozesse sensitiv ist. Außerdem sind die Makrophagen

hinsichtlich ihres Reifezustands sicher nicht homogen (44) und man kann davon ausgehen, daß sich die einzelnen Makrophagen in ihrer Abtötungskapazität unterscheiden.

5. Bakterizide Aktivität eines Xanthinoxidase-Systems gegen S.typhimurium

Über die Natur der mikrobiziden Aktivitäten von mononuklearen Phagozyten existieren bisher kaum experimentell bestätigte Vorstellungen. Im Gegensatz dazu sind polymorphnukleare Leukozyten in dieser Hinsicht vielfach bearbeitet worden. Besonders deren erste Reaktionen bei Kontakt mit Bakterien und anderem partikulären Material waren, vor allem in den letzten 10 Jahren, Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die starke Zunahme des durch Cyanid nicht hemmbaren Sauerstoffverbrauchs (96) und die Aktivierung des Hexosemonophosphat-Wegs (97) bei Granulozyten nach Stimulierung mit phagozytischen Partikeln war bereits seit langem bekannt. Erst auf Grund neuerer Untersuchungen wurde der Zusammenhang dieser Phänomene deutlich. Es wurde gefunden, daß durch den bei Phagozytose erhöhten Zellstoffwechsel eine an der Zelloberfläche lokalisierte (98) NADPH-Oxidase aktiviert wird (99,100), die NADPH als Elektronen-Donor zur direkten Reduktion von Sauerstoff zum Superoxid-Anion (O_2^-) verwendet (101,102,103). Dadurch wird der Hexosemonophosphat-Weg, der über die Konzentration an $NADP^+$ reguliert wird, stimuliert. Das Superoxid-Anion ist ein hochreaktives Produkt und kann spontan unter Bildung von Singulett-Sauerstoff (1O_2), einer angeregten Form des Sauerstoffs, und Wasserstoffperoxid dismutieren (104,105). Außerdem kann es in der nach Haber und Weiss benannten Reaktion (106):



neben Singulett-Sauerstoff auch das äußerst stark oxidierende Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) erzeugen (107). Es ist nicht bekannt, ob die genannten Produkte des Superoxid-Anions auch bei phagozytischen Granulozyten extra- und intrazellulär ausschließlich über die angegebenen Reaktionen entstehen. Das ist bei den vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten der verschiedenen Sauerstoff-Metaboliten untereinander (108) aber kaum anzunehmen.

Die Kinetik der Stimulierung dieses oxidativen Metabolismus' erfolgt sehr rasch; so kann bereits 10 Sekunden nach Partikelzugabe zu Zellen frisch entstandenes Wasserstoffperoxid gemessen werden (109).

Für jeden dieser reaktiven Sauerstoff-Metaboliten (O_2^- , 1O_2 , H_2O_2 und $\cdot OH$) gibt es Beispiele, die ihre Beteiligung an der Bakterizidie durch Granulozyten nahelegen (110,111). Daß diesem oxidativen Metabolismus, trotz der unbestreitbaren Rolle der lysosomalen Enzyme (111), die ebenfalls bei Interaktion mit Immunkomplexen und anderen Partikeln freigesetzt werden (112,113), eine entscheidende Funktion in der Abtötungskapazität durch polymorphnukleare Leukozyten zukommt, legen folgende Tatsachen nahe: a.) Unter anaeroben Bedingungen ist die bakterizide Aktivität von Phagozyten vermindert (114). b.) Leukozyten von Patienten mit chronischer Granulomatose, die sich in einer geringen Widerstandskraft gegen bakterielle Infektionen äußert, besitzen eine defekte oder zumindest nicht aktivierbare NADPH-Oxidase (100), erzeugen weder Superoxid-Anion (115) noch Wasserstoffperoxid (116) und sind trotz einer sonst normalen Aufnahme von Mikroorganismen nicht in der Lage, diese abzutöten (117).

Analoge Untersuchungen bei mononuklearen Phagozyten wurden erst in den letzten Jahren durchgeführt, allerdings fast ausschließlich an humanen Monozyten, also im Blut zirkulierenden Zellen. Bei Stimulierung dieser Zellen mit Immunkomplexen, Bakterien oder Zymosan konnte, wie bei Granulozyten, eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs (118), Aktivierung des Hexosemonophosphat-Wegs (119), Bildung von Superoxid-Anion (118,120), Wasserstoffperoxid (118) und Hydroxylradikal (121) nachgewiesen werden. Sämtliche genannten Reaktionen sind aber nicht so ausgeprägt wie bei Granulozyten. Sagone et al. (119) fanden jedoch Hinweise dafür, daß bei der Abtötung von Staphylokokken durch humane Monozyten oxidative Prozesse beteiligt sind.

Um Einblick in die Mechanismen der Abtötung von S.typhimurium durch Makrophagen zu gewinnen, haben wir folgenden Ansatz gewählt. Ausgehend von der Tatsache, daß die Bildung von aktivem Sauerstoff durch Phagozyten bereits durch das Anhaften von Bakterien an die Plasmamembran ausgelöst wird, wollten wir zunächst den bakteriziden Effekt nur der Sauerstoff-Metaboliten auf S.typhimurium untersuchen. Bei Phagozyten ist es aber nicht möglich, mit Partikeln selektiv den oxidativen Stoffwechsel

zu stimulieren und dabei z.B. eine Ausschüttung lysosomaler Enzyme oder die Einwirkung weiterer bakterizider Aktivitäten auszuschließen. Wir haben deshalb ein zellfreies System verwendet (V.8.), das bei der aeroben Oxidation von Xanthin durch Xanthinoxidase ebenfalls Superoxid-Anion, Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid (122) und wahrscheinlich auch Hydroxyl-Radikale (123) erzeugt. In Anpassung an die Zeit, innerhalb der die membrangebundene Abtötung durch Makrophagen erfolgt (vgl. Abb. 17), wurden die Bakterien 5 Minuten lang mit dem Enzymsystem inkubiert.

Bakterien behandelt mit	Überlebende Bakterien (%)	
	SF 10223	SF 1826
—	100	100
Xanthinoxidase-System	101	102
Lysozym	51	67
Xanthinoxidase-System + Lysozym	20	49

Tab. 11: Bakterizide Aktivität des Xanthin/Xanthinoxidase-Systems und von Lysozym auf avirulente (SF10223) und virulente (SF1826) S.typhimurium. 10^6 nicht opsonisierte Bakterien wurden 5 Minuten bei 37°C in 1,1 ml Reaktionsansatz mit Xanthin und Xanthinoxidase inkubiert, der in dieser Zeit ca. 20 nM Superoxid erzeugte. Nach 30 Minuten bei 0°C wurden die Bakterien plattiert. Zur Lysozymbehandlung wurden während der 30-minütigen Inkubation bei 0°C 100 $\mu\text{g/ml}$ Lysozym zugegeben. Zur Kontrolle wurden Bakterien im Reaktionsansatz ohne Xanthin inkubiert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus 2 - 3 Versuchen dar.

Wie Tab. 11 zu entnehmen ist, hat die Inkubation in dem Xanthinoxidase-System weder auf die avirulenten noch auf die virulenten S.typhimurium einen bakteriziden Effekt, wenn die Bakterien 30 Minuten nach der Behand-

lung plattiert und dann über Nacht für die Kolonienzählung inkubiert wurden. Dennoch ist eine subletale Schädigung der Bakterien denkbar, die den Angriff anderer bakterizider Aktivitäten erleichtern könnte. Um diese Möglichkeit zu prüfen, haben wir der Inkubation mit Xanthinoxidase bei 37°C eine Behandlung mit Lysozym bei 0°C von 30 Minuten angeschlossen. In Tab. 11 ist ebenfalls zu sehen, daß durch die kombinierte Behandlung der Bakterien mit Xanthinoxidase und Lysozym der Anteil der lebenden avirulenten Bakterien auf 20% und der der virulenten auf 50% abnimmt. Bakterien, die nur einer Behandlung mit Lysozym ausgesetzt waren, wurden aber auch schon in einem begrenzten Umfang abgetötet, und zwar der avirulente Stamm stärker als der virulente. Die Einwirkung von aktivem Sauerstoff auf die Bakterien erhöht also bei beiden untersuchten Stämmen die Empfindlichkeit für Lysozym. Dieser Effekt ist bei dem avirulenten S.typhimurium stärker ausgeprägt als bei dem virulenten.

In einem weiteren Versuch wurde die bakterizide Kapazität der Kombination von Xanthinoxidase und Lysozym unter optimalen Bedingungen der Enzymaktivität getestet. Dazu wurden die Bakterien 30 Minuten bei 37°C gleichzeitig mit beiden Enzymen inkubiert. Unter diesen Bedingungen überlebten, bezogen auf unbehandelte Kontrollen, 3% der avirulenten und 6% der virulenten Bakterien. Dies demonstriert die bakterizide Effektivität, welche durch die Kombination von aktivem Sauerstoff und Lysozym erreicht werden kann.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man zu folgenden Annahmen kommen. Die Inkubation mit reaktivem Sauerstoff führt zu Schädigungen der Bakterien. Letale Folgen entstehen daraus aber erst bei zusätzlicher Einwirkung weiterer potentiell bakterizider Agentien. Optimale Bedingungen, wie es die Inkubation auf Komplett-Agar darstellt, ermöglicht es anscheinend den Bakterien, den durch aktiven Sauerstoff gesetzten Schaden zu reparieren.

Um diese Annahme zu überprüfen, haben wir die Bakterien nicht unmittelbar nach der 5-minütigen Inkubation mit Xanthinoxidase plattiert, sondern noch 24 Stunden unter suboptimalen Bedingungen gehalten. Dazu wurden die Bakterien mit PBS verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Unter diesen ungünstigen Bedingungen nimmt die Zahl lebender unbehandelter Bakterien, ohne deutlichen Unterschied zwischen den beiden untersuchten Stämmen, um ca. 30% ab. Bezogen auf diese Kontrollen betrug nach Einwir-

kung von aktivem Sauerstoff die Zahl der überlebenden Bakterien $49 \pm 17\%$ bei avirulenten und $47 \pm 13\%$ beim virulenten Stamm (Mittelwerte aus 4 Versuchen). Das bestätigt unsere Vermutung, daß die Bakterien durch die Einwirkung von reaktivem Sauerstoff allein nur subletal geschädigt werden. Die Sauerstoffempfindlichkeit von S.typhimurium SF10223 und SF1826 ist dabei gleich.

Opsonisierung der Bakterien mit Normalserum und/oder Antiserum blieb bei allen verwendeten Versuchsbedingungen mit dem Xanthinoxidase-System ohne wesentlichen Einfluß auf die Bakterien. Das könnte man damit erklären, daß beide von uns untersuchten Salmonella-Stämme gegen das verwendete Komplement resistent sind. Der Opsonisierung kommen offensichtlich erst Funktionen zu, wenn die Bakterien anschließend mit Phagozyten in Berührung kommen (siehe Tab. 3 und Abb. 17).

Zum Abschluß dieser Untersuchungen soll betont werden, daß die Verhältnisse in einem Inkubationsansatz, wie sie sich in den hier beschriebenen Experimenten ergaben, sicher nicht mit denen an der Oberfläche von Phagozyten gleichzusetzen sind. Bakterien, die an Makrophagen haften, sind wahrscheinlich einer massiveren Einwirkung von aktivem Sauerstoff ausgesetzt und praktisch gleichzeitig auch dem gesamten Angriff der lysosomalen Enzyme. Unter diesen Bedingungen ist es denkbar, daß der Schädigung der Bakterien durch oxidative Prozesse eine entscheidendere Bedeutung zukommt, als es die hier beschriebenen zellfreien Modeliversuche zeigen konnten.

6. Biochemische Untersuchungen zu möglichen Virulenzfaktoren von S.typhimurium

Bakteriologische Untersuchungen, die bisher an den beiden von uns verwendeten S.typhimurium-Stämmen SF10223 (avirulent) und SF1826 (virulent) durchgeführt worden waren, hatten keine Unterschiede zwischen diesen beiden Stämmen aufgedeckt. So waren morphologisch auch mit dem Elektronenmikroskop keine Unterschiede zu erkennen. Die Bakterien beider Stämme hatten die Gestalt von Kurzstäbchen, waren peritrich begeißelt und fimbriert. Das Wachstumsverhalten in verschiedenen Flüssig-

medien war gleich. In diesem Kapitel sind Versuche dargestellt, die klären sollen, welche Faktoren es dem virulenten Stamm von S.typhimurium ermöglichen könnten, den bakteriziden Aktivitäten der Makrophagen besser zu widerstehen, als dies der avirulente Stamm kann.

Ein Grund, der zur stärkeren Abtötung der avirulenten Bakterien beitragen kann, mag deren erhöhte Empfindlichkeit für Lysozym sein, wie es in Experimenten des vorangehenden Kapitels festgestellt wurde. Die molekulare Basis dieser verstärkten Sensitivität bleibt aber noch zu klären. Im folgenden soll das Problem der oxidativen Abtötung betrachtet werden.

6.1. Bestimmung der Superoxid-Dismutase-Aktivität der Bakterien

Aktiver Sauerstoff, der durch ein Xanthinoxidase-System erzeugt wird, führt zur Schädigung von avirulenten und virulenten S.typhimurium (II.5.). Wenn oxidative Prozesse auch bei der Abtötung der Bakterien durch Makrophagen eine entscheidende Rolle einnehmen, dann kann man Schutzmechanismen der Bakterien gegen Sauerstoff-Metaboliten als Virulenzfaktoren sehen.

Es ist bekannt, daß die Abtötung von E.coli und Staphylococcus aureus durch Granulozyten durch Zugabe von Superoxid-Dismutase gehemmt werden kann (111). Dieses Enzym macht das Superoxid-Radikal unschädlich (124). Außer obligaten Anaerobiern bilden alle Bakterien unter Kulturbedingungen, bei denen aerobe oxidative Phosphorylierung stattfindet, Superoxid-Dismutase (125). Ein Zusammenhang zwischen Sauerstofftoxizität und Superoxid-Dismutase konnte bei E.coli nachgewiesen werden (126). Bakterien mit einem erhöhten Gehalt an Superoxid-Dismutase, der sich bei Wachstum unter 100% Sauerstoff induzieren läßt (126), waren resistenter gegen den letalen Effekt des Antibiotikums Streptonigrin als Bakterien mit einem niedrigeren Gehalt dieses Enzyms. Es ist bekannt, daß die Wirkung von Streptonigrin zu Superoxidbildung führt (127), indem wahrscheinlich reduziertes Streptonigrin direkt Sauerstoff zu O_2^- reduzieren kann (128). Weiterhin war man zum Zeitpunkt der hier beschriebenen Arbeit auf Grund der Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Fridovich (129) allgemein der Ansicht, daß Superoxid-Dismutase Bakterien vor exogenem Superoxid

schützen kann. Diese Autoren berichteten über die konstitutive Synthese einer periplasmatischen Superoxid-Dismutase bei E.coli, zusätzlich zu der regulierten Synthese im Zytoplasma. Sie nahmen an, daß das periplasmatische Enzym zum Schutz vor exogenem Superoxid-Radikal dient.

Es lag also nahe, den Gehalt an Superoxid-Dismutase der beiden untersuchten Salmonella-Stämme zu vergleichen. Wir haben die Bakterienhomogenate auf zwei verschiedene Arten gewonnen, um eventuelle Einflüsse der Aufschlußmethoden auf die Enzymaktivität auszuschließen. Die Aktivität der Superoxid-Dismutase wurde über ihre Hemmung der Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium durch Xanthin/Xanthinoxidase bestimmt (130). Die von uns erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 12 dargestellt.

Zellaufschluß	Spezifische Aktivität der SOD (U/mg) von	
	SF 10223	SF 1826
Mechanisch ^a	1,3	1,4
Lyse ^b	2,9	2,8

Tab. 12: Spezifische Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) von avirulenten (SF10223) und virulenten (SF1826) S.typhimurium in unfraktionierten Homogenaten. Der Proteingehalt der Homogenate nach mechanischem Aufschluß betrug für beide Stämme 5,8 mg/ml und nach Lyse für SF10223 2,2 mg/ml bzw. für SF1826 2,0 mg/ml nach jeweils gleicher Aufarbeitung der beiden Stämme. a: French Presse mit 1200 kg/cm²; b: EDTA- und Lysozymbehandlung.

Es ist zu sehen, daß avirulente (SF10223) und virulente (SF1826) S.typhimurium gleiche spezifische Aktivität und gleichen Gehalt an Superoxid-Dismutase haben. Die Superoxid-Dismutase ist also für die untersuchten Bakterienstämme kein Virulenzfaktor.

Wir haben auch den Versuch einer Lokalisierung der Superoxid-Dismutase bei S.typhimurium unternommen. Dazu wurde das mit der French-Presse gewonnene Homogenat zur Trennung von löslicher und partikulärer Fraktion 2 Stunden bei 40 000 UpM zentrifugiert. Bei S.typhimurium SF10223 befanden sich 96% und bei SF1826 94% der Gesamtaktivität in der löslichen Fraktion. Dies ist ein Hinweis darauf, daß bei S.typhimurium die Superoxid-Dismutase nicht in der Zellwand oder der Membran lokalisiert ist. Eine Schutzfunktion vor exogenem Superoxid-Anion wäre somit nicht zu erwarten. Diese Ergebnisse machen es verständlich, daß Superoxid-Dismutase als Virulenzfaktor keine Rolle spielt.

Dies ist auch durch neueste Untersuchungen bei E.coli bestätigt worden, welche die Existenz einer periplasmatischen Superoxid-Dismutase widerlegt haben (131). Demnach würde die Funktion der bakteriellen Superoxid-Dismutase auf den Schutz vor endogenem Superoxid, das bei der Atmungskettenphosphorylierung auftritt, beschränkt sein.

6.2. Proteinzusammensetzung der äußeren Membran von S.typhimurium

Virulenzfaktoren sind vorwiegend in der Oberfläche von Pathogenen zu suchen. Über die Zellwand treten die infizierenden Organismen mit den Zellen des Wirts in Kontakt. Neben enzymatischen Komponenten sind dabei vor allem strukturelle Elemente der Oberfläche von Pathogenen von entscheidender Bedeutung. Das Lipopolysaccharid, ein charakteristischer Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, wird als Virulenzfaktor schon seit langem untersucht. So ist bekannt, daß bereits quantitative Unterschiede im Gehalt an Endotoxin die Virulenz von Bakterien beeinflussen können (32). Auch die qualitative Zusammensetzung des O-spezifischen Polysaccharids, die sich in der Ausprägung bestimmter Antigenfaktoren ausdrückt, konnte in mehreren Fällen mit der Virulenz von Salmonella-Stämmen in Verbindung gebracht werden (33,132). Frühere Untersuchungen in diesem Labor haben jedoch gezeigt, daß die beiden hier verwendeten Stämme SF10223 und SF1826 von S.typhimurium die gleiche serologische Spezifität und den gleichen Lysotyp besitzen (54). Auch hinsichtlich Lipopolysaccharidgehalt und -zusammensetzung waren keine Unterschiede feststellbar.

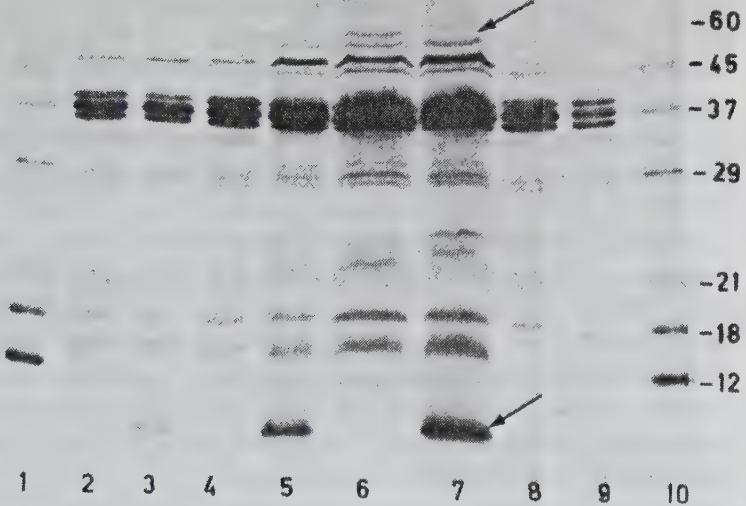


Abb. 18: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der äußeren Membranproteine von virulenten (SF1826) und avirulenten (SF10223) *S. typhimurium*. Die Proben 1 und 10 enthalten Standardproteine mit den angegebenen Molekulargewichten in k Dalton. 2 - 7 sind Präparationen von Bakterien, die mit EDTA und Lysozym aufgeschlossen und von denen folgende Proteinmengen aufgetragen wurden : 15 µg Protein von SF10223 (2), 16 µg von SF1826 (3), 40 µg von SF10223 (4), 40 µg von SF1826 (5), 74 µg von SF10223 (6) und 80 µg von SF1826 (7). 8 und 9 sind Proben von Bakterien nach Aufschluß mit der French-Press: SF1826 (8) und SF10223 (9). Die Acrylamidkonzentration betrug 13%. Die Pfeile weisen auf Unterschiede des Proteinmusters des virulenten Stammes gegenüber dem avirulenten hin.

Wir haben deshalb die Proteine, als die zweite wesentliche Komponente der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, untersucht. Empfindliche Methoden zur Isolierung und Analyse dieser Membranproteine stehen seit einigen Jahren zur Verfügung (133,134). Es sind aber bisher noch keine Untersuchungen bekannt, in denen Proteine der äußeren Membran als Virulenzfaktoren bei gram-negativen Bakterien nachgewiesen werden konnten. Wir haben Proteinmuster von äußeren Membranpräparationen von avirulenten (SF10223) und virulenten (SF1826) S.typhimurium durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gewonnen, die in Abb. 18 wiedergegeben sind.

Zur elektrophoretischen Trennung wurden verschiedene Proteinkonzentrationen aufgetragen, damit sowohl eventuelle Unterschiede in den Hauptproteinen als auch in den Nebenproteinen erkennbar werden. Abb. 18 ist zu entnehmen, daß sich die beiden Bakterienstämme nicht in ihren Hauptmembranproteinen unterscheiden. Im Proteinmuster des virulenten Stammes fehlt, verglichen mit dem des avirulenten, jedoch ein Protein mit einem Molekulargewicht um 55 000, und es tritt eine niedermolekulare Bande an der Gelfront auf. Diese Unterschiede im Proteinmuster der äußeren Membran zwischen virulenten und avirulenten S.typhimurium können vorläufig nur als Tatsache festgestellt werden. Erst weitere Versuche müssen zeigen, ob darin auch Virulenzfaktoren zu sehen sind.

7. Chemilumineszenz bei der Interaktion von Peritonealmakrophagen mit S.typhimurium

Allen et al. (135) entdeckten 1972, daß der oxidative Metabolismus von Granulozyten, der durch die Phagozytose von Partikeln ausgelöst wird, auch zur Erzeugung von Chemilumineszenz führt. Deren Ursache ist noch unvollständig geklärt. Eine entscheidende Beteiligung von Singulett-Sauerstoff, der seine erhöhte Energie beim Übergang in den Grundzustand in Form von Licht abgibt, wird aber allgemein angenommen (111,135,136). Da Chemilumineszenz mit Superoxid-Anion-Produktion gekoppelt ist (105,111,136) und Leukozyten von Patienten mit chronischer Granulomatose auch nicht mit Chemilumineszenz auf Kontakt mit opsonisierten Bakterien reagieren (137), hat sich die Messung der Chemilumineszenz als Indikator für den oxidativen Meta-

bolismus bewährt, zurnal diese auf einfache Weise und ohne weitere Behandlung der Zellen in Flüssigkeits-Szintillations-Messgeräten (Packard) zu verfolgen ist (137,138).

Als die hier vorliegende Arbeit begonnen wurde, erschienen die ersten Berichte über den Nachweis von Chemilumineszenz bei Monozyten, die aber ausschließlich an humanen Zellen durchgeführt worden waren (119,139,140). Daraus ergab sich für die von uns untersuchte Problematik folgende Fragestellung: Läßt sich auch bei der Interaktion von S.typhimurium mit Mäuse-Peritonealmakrophagen Chemilumineszenz nachweisen? Wenn ja, besteht eine Korrelation zwischen dem oxidativen Metabolismus der Makrophagen, gemessen als Chemilumineszenz, und der Abtötung der Bakterien?

7.1 Nachweis der Chemilumineszenz

Ziel der Untersuchungen war es zunächst zu prüfen, ob es mit Makrophagen bei Kontakt mit S.typhimurium zu Chemilumineszenz kommt, und zwar unter Bedingungen, die eine intrazelluläre Abtötung der Bakterien bewirken. Wie im Abschnitt II.1.1.2. dargestellt, war das Bakterien-Makrophagen-Verhältnis bei diesen Untersuchungen wichtig. Die Reaktion ist hier am Beispiel von C3Hf-Makrophagen und S.typhimurium SF10223 beschrieben. Wie Kontrollversuche gezeigt haben, gelten die so erarbeiteten Bedingungen auch für die anderen Kombinationen der verwendeten Makrophagen- und Salmonella-Stämme.

7.1.1. Chemilumineszenz mit normalen Makrophagen

Abb. 19 gibt das Ergebnis einer repräsentativen Messung wieder, die direkt in Packard-Gläschen durchgeführt werden kann.

Es ist ersichtlich, daß nur in Gegenwart von Luminol (3-Aminophthalhydrazid) eine deutliche Reaktion auf die Zugabe von opsonisierten lebenden Bakterien zu den Makrophagenkulturen erhalten wird. Während Bakterien und Luminol allein sich gegenüber dem Leerwert, der nur Medium und Luminol enthielt, nicht unterscheiden, zeigen Makrophagen mit Luminol

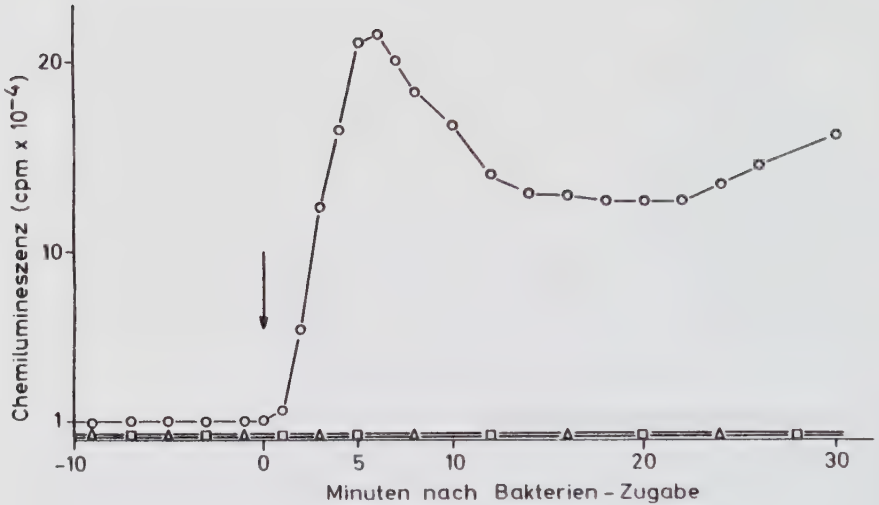


Abb. 19: Nachweis der Chemilumineszenz von normalen C3Hf-Makrophagen nach Zugabe von *S.typhimurium* SF10223. 3×10^6 Peritonealzellen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden 2×10^6 mit Normalserum opsonisierte lebende Bakterien zu Kulturen gegeben, denen Luminol zugesetzt war (o) oder nicht (□), ebenso zu Kontrollen ohne Makrophagen aber mit Luminol (Δ). Die Chemilumineszenz wurde bereits ab 10 Minuten vor Zugabe der Bakterien im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät bestimmt.

eine gleichmäßige Grundaktivität von ca. 10 000 cpm. Bereits 1 Minute nach Zugabe der Bakterien ist ein starker Anstieg der Chemilumineszenz-Intensität festzustellen, der nach 6 Minuten ein Maximum von über dem 20-fachen der Grundaktivität erreicht. Daß unter diesen Versuchsbedingungen nur eine Luminol-abhängige Chemilumineszenz zu beobachten ist, wird durch

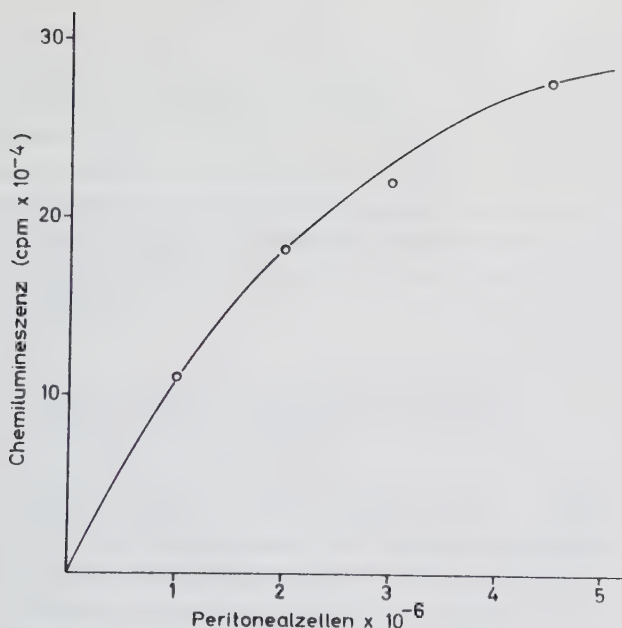


Abb. 20: Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Makrophagenzahl. Peritonealzellen aus normalen C3Hf-Mäusen wurden in den angegebenen Mengen in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $1,5 \times 10^6$ mit Normalserum opsonisierte S.typhimurium SF10223 zugegeben und die Chemilumineszenz im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. In der Darstellung sind die Chemilumineszenz-Maxima 5 Minuten nach Zugabe der Bakterien angegeben (Mittelwerte von 2 Parallelansätzen).

einen Vergleich mit Ansätzen anderer Autoren (140,141) verständlich. Bei 10- bis 50-fach höheren Zellkonzentrationen und Partikel/Phagozyten-Verhältnissen von ca. 100:1 wurden dort ohne Luminol Chemilumineszenz-Maxima erhalten, die nur 2 - 10-fach über der Grundaktivität lagen. Luminol kann diese natürliche Chemilumineszenz bis zum Faktor 5×10^3 verstärken (142), ohne qualitative Differenzen in der Kinetik zu erzeugen (142,143).

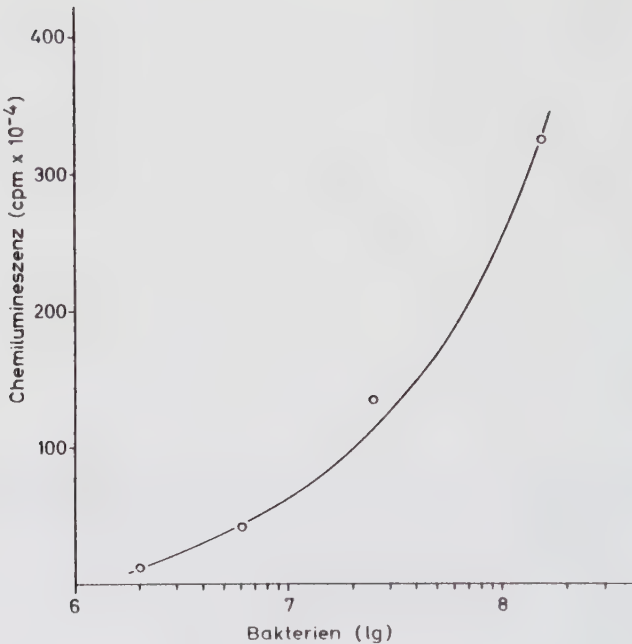


Abb. 21: Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Bakterienkonzentration. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen aus normalen C3Hf-Mäusen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden mit Normalserum opsonisierte S.typhimurium SF10223 in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt und die Chemilumineszenz im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. In der Darstellung sind jeweils die Chemilumineszenz-Maxima 5 bis 7 Minuten nach Zugabe der Bakterien angegeben (Mittelwerte von 2 Parallelansätzen).

Weder die Natur der direkten noch die der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz ist bis heute aufgeklärt. Damit ist auch nicht bekannt, durch welche Sauerstoff-Spezies Luminol oxydiert wird.

Die Abhängigkeit von der Makrophagenzahl und der Bakterienkonzentration bestätigte auch, daß die gemessene Chemilumineszenz Ausdruck der Interaktion von Makrophagen mit S.typhimurium ist.

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, nimmt mit zunehmender Rasendichte der Makrophagen die Chemilumineszenz zu. Abb. 21 zeigt, daß die Chemilumineszenz ebenso eine Funktion der Zahl der zugegebenen Bakterien darstellt. Dabei fällt auf, daß sich die Dosisabhängigkeit dieser Reaktion beträchtlich von der der bakteriziden Kapazität unterscheidet. Chemilumineszenz findet noch bei Bakterien/Peritonealzell-Verhältnissen statt, bei denen eine intrazelluläre Abtötung der Bakterien nicht mehr nachzuweisen ist (siehe Abb. 5).

7.1.2. Chemilumineszenz mit aktivierten Makrophagen

Die Untersuchungen wurden mit Peritonealzellen aus infizierten Tieren durchgeführt. Dabei wurden genauso viele Zellen in Packard-Gläschen eingesät, wie das bei Makrophagen aus Normaltieren geschehen war. Der Anteil adhärenter Makrophagen war ca. 20% niedriger gegenüber Zellen aus Normaltieren (siehe II.1.2.2.).

Abb. 22 zeigt, daß die maximale Chemilumineszenz mit aktivierten und normalen Makrophagen 5 Minuten nach Zugabe opsonisierter Bakterien erreicht wird. Sie ist bei aktivierten Makrophagen 15-mal stärker als bei normalen. Trotzdem ist auch diese Reaktion nur in Gegenwart von Luminol erfaßbar. Die Grundaktivität aktivierter Makrophagen war doppelt so groß wie die normaler Makrophagen.

Verschiedene Autoren haben berichtet, daß durch Ultraschallbehandlung erhaltene Homogenate von Granulozyten (105) und normalen Makrophagen (142) keine Chemilumineszenz mehr zeigen nach Zugabe von Agentien, die intakte Zellen zu Chemilumineszenz anregen. Dies konnten wir auch für aktivierte Makrophagen bestätigen. Es gelang uns nicht, durch Zugabe von NADPH oder NADH (Substrat für NADPH-Oxidase) das Zellhomogenisat zur Chemilumineszenz anzuregen. Dadurch wird die Notwendigkeit intakter Zellen für eine Chemilumineszenz-Respons auf Bakterien auch bei hochreaktiven aktivierten Makrophagen deutlich.

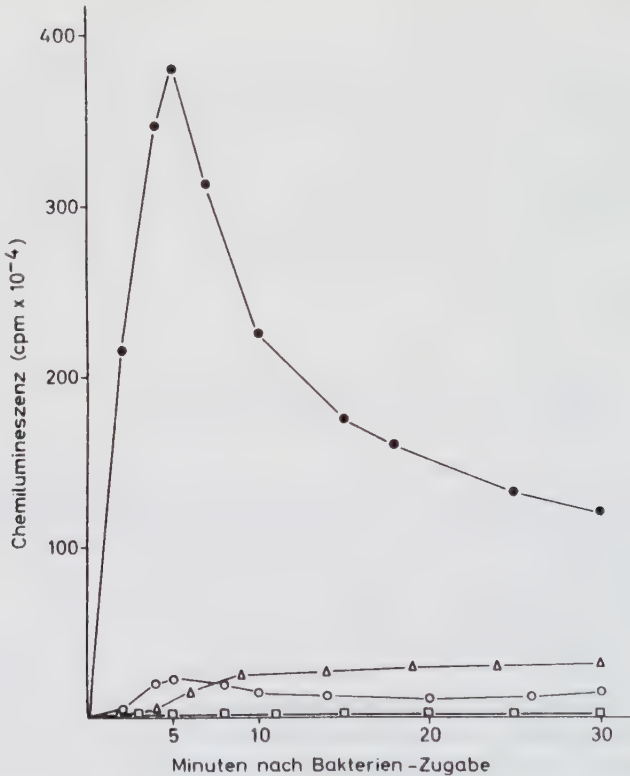


Abb. 22: Chemilumineszenz-Respons von aktivierten und normalen C3Hf-Makrophagen auf *S.typhimurium* SF10223. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgte durch i.p. Injektion von 2×10^3 lebenden *S.typhimurium* SF10223. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $1,5 \times 10^6$ mit Normalserum opsonisierte Bakterien zu normalen (○), aktivierten (●) oder aktivierten Makrophagen gegeben, die vorher 1 Minute mit Ultraschall behandelt worden waren (Δ). Diesen Ansätzen war vor Bakterienzugabe auch Luminol zugesetzt worden. Zur Kontrolle wurden Kulturen aktivierter Makrophagen ohne Luminol (□) ebenfalls Bakterien zugegeben. Die Chemilumineszenz wurde im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt.

7.2. Untersuchungen zur Korrelation von Chemilumineszenz und bakterizider Aktivität der Makrophagen

Nachdem es uns gelungen war zu zeigen, daß es bei der Interaktion von Peritonealmakrophagen mit S.typhimurium zur Erzeugung von Chemilumineszenz kommt, konnten wir die Frage klären, welche Korrelation zwischen Chemilumineszenz und Abtötung der Bakterien besteht. Auf diesem Wege erhofften wir Aussagen über die Relevanz des oxidativen Metabolismus der Makrophagen, zumindest soweit er durch Chemilumineszenz erfaßbar ist, für die Abtötung von S.typhimurium zu erhalten. Die zellfreien Modellversuche mit dem Xanthinoxidase-System (II.5.) hatten demonstriert, daß eine Schädigung der Bakterien durch aktiven Sauerstoff möglich ist. Sollten oxidative Prozesse eine wesentliche Komponente des bakteriziden Mechanismus der Makrophagen darstellen, so kann man annehmen, daß sich Zusammenhänge zwischen Chemilumineszenz und Bakterientötung erkennen lassen. Dabei wäre sowohl eine Korrelation der Chemilumineszenz mit der frühen, membrangebundenen Abtötung als auch mit der späteren, intrazellulären Abtötung denkbar; denn auch für die zweite Phase der Abtötung kann eine entscheidende Beteiligung von oxidativen Prozessen, die bereits an der Membran erfolgten, nicht ausgeschlossen werden. Auch bei der sauerstoffabhängigen Bakterizidie der Granulozyten ist nicht bekannt, ob diese bereits an der Membran oder erst intrazellulär geschieht. Bei den bisherigen Versuchen blieb ebenso offen, ob eine extrazelluläre Freisetzung aktiven Sauerstoffs nur solange stattfindet, bis sich das bildende Phagosom von der Membran abgeschnürt hat.

7.2.1. Vergleich der Chemilumineszenz-Respons von normalen Makrophagen aus infektresistenten C3Hf- und infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen auf virulente und avirulente S.typhimurium

Wir haben zuerst die Chemilumineszenz von normalen Makrophagen aus infektresistenten C3Hf- und infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen, hervorgerufen durch avirulente (SF10223) und virulente (SF1826) S.typhimurium, in Parallelversuchen unter gleichen Bedingungen gemessen. Abb. 23 gibt einen repräsentativen Versuch wieder.

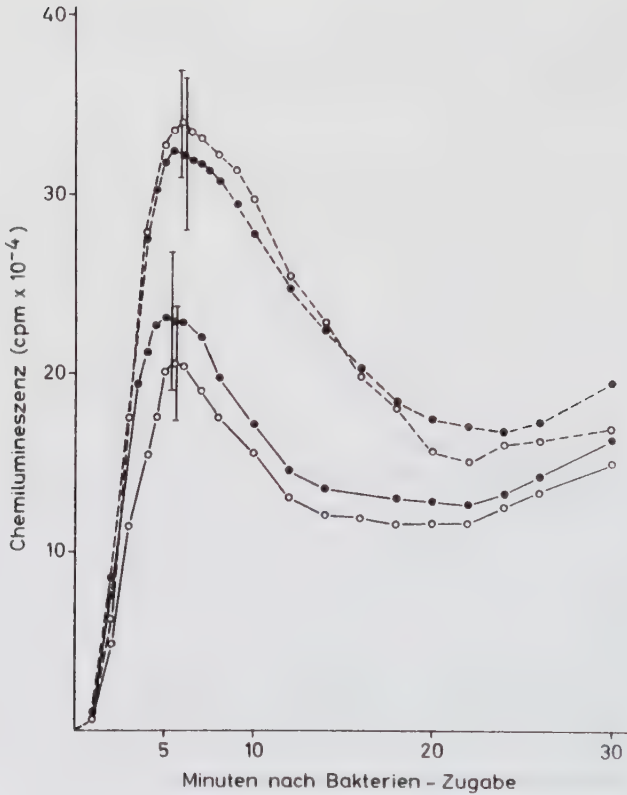


Abb. 23: Chemilumineszenz-Respons von normalen Makrophagen aus infektresistenten C3Hf- (—) und sensitiven C57Bl/6-Mäusen (---) auf avirulente (SF10223) (o) und virulente (SF1826) (●) *S.typhimurium*. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 2×10^6 mit Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben und die Chemilumineszenz im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. Es sind Mittelwerte $\pm$ SA von 3 parallelen Ansätzen dargestellt.

Unabhängig von ihrer Fähigkeit, die Bakterien abzutöten (vgl. Abb. 11), geben die Makrophagen beider Mäusestämme bei Interaktion mit avirulenten und mit virulenten S.typhimurium die gleiche Chemilumineszenz-Respons. In den meisten Versuchen reagierten dabei die Makrophagen aus sensitiven C57Bl/6-Mäusen mit stärkerer Chemilumineszenz als die aus resistenten C3Hf-Mäusen.

7.2.2. Vergleich der Chemilumineszenz-Respons auf S.typhimurium SF1826 und E.coli F492

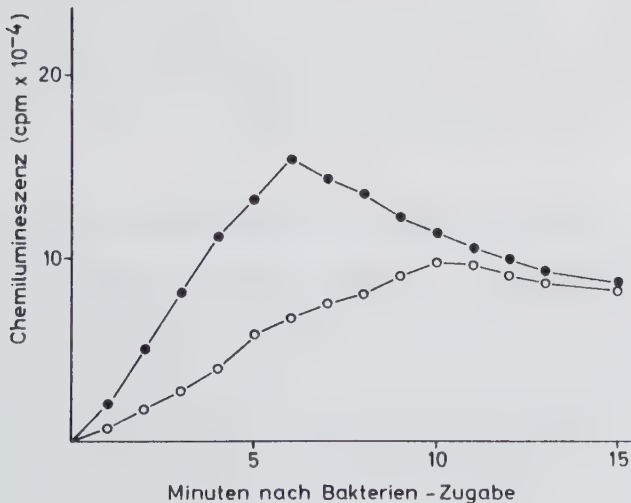


Abb. 24: Vergleich der Chemilumineszenz-Respons normaler C57Bl/6-Makrophagen auf S.typhimurium SF1826 (●) und E.coli F492 (○). Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $1,5 \times 10^6$ mit absorbiertem Normalserum opsonisierte Bakterien zugegeben und die Chemilumineszenz im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. Es sind die Mittelwerte von 2 parallelen Ansätzen dargestellt.

Da mit Makrophagen beider Mäusestämme kein Unterschied in der Chemilumineszenz-Respons auf die S.typhimurium-Stämme verschiedener Virulenz gefunden wurde, wollten wir die Möglichkeit überprüfen, ob es sich bei der Chemilumineszenz dieser Makrophagen um eine Reaktion handelt, die immer gleichartig abläuft, unabhängig von der Art der zugegebenen Bakterien. Wir haben deshalb zum Vergleich die Reaktion auf den apathogenen E.coli F492 untersucht. Um einen Einfluß eventuell vorhandener natürlicher Antikörper auszuschließen, wurden zur Opsonisierung der Bakterien Normalseren verwendet, die in der Kälte mit den Bakterien absorbiert waren.

Abb. 24 zeigt für E.coli eine von S.typhimurium deutlich verschiedene Reaktionskinetik. Dies zeigt, daß die Chemilumineszenz-Respons auf Bakterien nicht grundsätzlich in gleicher Weise abläuft. Möglicherweise kommen in der Chemilumineszenz erst sehr große Pathogenitätsunterschiede, eventuell durch deutlich unterschiedene Oberflächenstrukturen, zum Ausdruck.

7.2.3. Einfluß freier Bakterien auf die Chemilumineszenz-Kinetik

Wir wollten die Ursachen für den Verlauf der Kinetik der Chemilumineszenz bei der Interaktion der Makrophagen mit S.typhimurium untersuchen. Dazu haben wir uns zunächst dem zweiten Anstieg der Reaktion nach ca. 20 Minuten zugewandt, der mit normalen Makrophagen zu beobachten ist (siehe Abb. 19 und 23). Da auch nach 20 Minuten Inkubation von Makrophagen mit opsonisierten Bakterien noch zahlreiche freie Bakterien nachweisbar sind, lag die Vermutung nahe, daß diese Zunahme der Chemilumineszenz-Intensität auf die Vermehrung der Bakterien im Zellkulturmedium zurückzuführen ist. Das wurde durch Messung der Chemilumineszenz (siehe Abb. 25) in Gegenwart von Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin (100 I.E./ml), bei Bestimmung der Zahl lebender Bakterien in den Überständen, bestätigt.

Die bisher angewandte Methode der Chemilumineszenz-Bestimmung erschwerte also eine Aussage über Vorgänge nach Aufnahme der Bakterien durch die Makrophagen, da während der Messung auch freie Bakterien vorhanden waren, die im Verlauf der Messung sedimentierten und dann mit Makrophagen reagierten. Um eine Trennung von Phagozytose-Phase

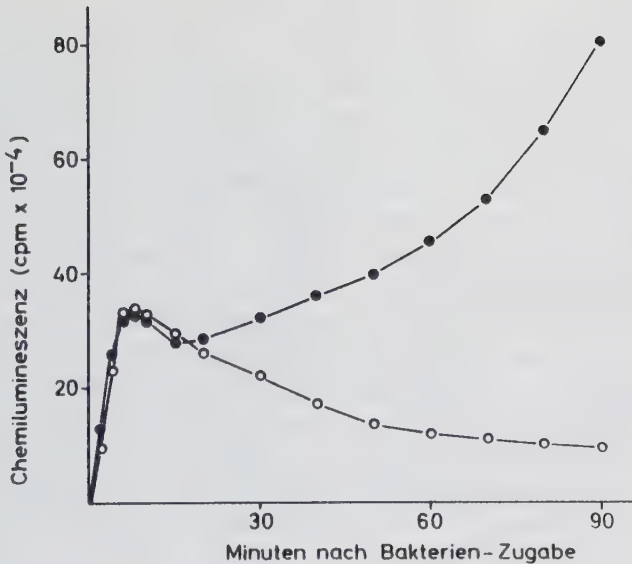


Abb. 25: Chemilumineszenz-Respons von C57Bl/6-Makrophagen auf *S.typhimurium* SF10223 in Anwesenheit (o) und Abwesenheit (●) von Penicillin und Streptomycin. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 2×10^6 mit Normalserum opsonisierte Bakterien zu Kulturen ohne oder mit Antibiotika gegeben und die Chemilumineszenz im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. Es sind die Mittelwerte von 2 parallelen Ansätzen dargestellt.

und intrazellulärem Geschehen zu erreichen, wurden, wie bei der Untersuchung der bakteriziden Aktivität der Makrophagen (V.7.1.3.), freie Bakterien entfernt. Dazu wurde nach Erreichen des Chemilumineszenz-Maximums (5 - 7 Minuten nach Zugabe der Bakterien) das überstehende Medium abdekantiert, der Makrophagenrasen zweimal mit warmem Medium gespült und in bakterienfreiem Medium mit Luminol weiterinkubiert.

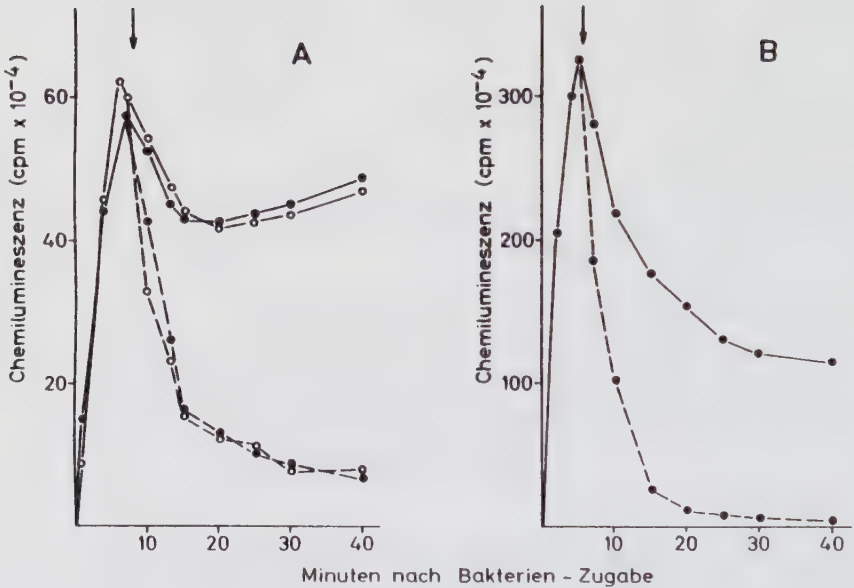


Abb. 26: Chemilumineszenz von normalen (A) und aktivierten (B) Makrophagen aus infektsensitiven C57Bl/6-Mäusen nach der Entfernung freier Bakterien. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgte durch i.p. Injektion von 2×10^3 S.typhimurium SF10223. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $2,5 \times 10^6$ mit Normalserum opsonisierte avirulente S.typhimurium SF10223 (○) oder virulente SF1826 (●) zu normalen Makrophagen und $1,5 \times 10^6$ virulente SF1826 zu aktivierten Makrophagen gegeben und die Chemilumineszenz im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. Nach Erreichen des Maximums wurden in der Hälfte der Ansätze freie Bakterien abgewaschen (Pfeil) und danach weitergemessen (---). Es sind Mittelwerte von 4, bzw. nach dem Waschen, von 2 parallelen Ansätzen dargestellt.

Abb. 26 zeigt, daß nach dieser Behandlung die Chemilumineszenz mit normalen und aktivierten Makrophagen stark absinkt. Dieses Verhalten ist mit aktivierten Makrophagen noch deutlicher ausgeprägt. Bei viel intensiverer Reaktion in den ersten fünf Minuten fällt die Chemilumineszenz nach dem Entfernen der freien Bakterien steil auf tiefere Werte als bei normalen Makrophagen ab. Aus Abb. 26 geht weiterhin hervor, daß mit normalen Makrophagen aus sensitiven C57Bl/6-Mäusen auch nach dem Entfernen freier Bakterien kein Unterschied zwischen der Chemilumineszenz-Respons auf virulente und avirulente Bakterien zu erkennen ist. Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, daß Chemilumineszenz unter diesen Bedingungen nicht Ausdruck intrazellulärer Prozesse ist und damit kein direktes Korrelat zur intrazellulären Abtötung darstellt. Vielmehr scheint die Chemilumineszenz eine Reaktion der Makrophagen auf den Kontakt von Bakterien mit der Zellmembran zu sein, die nach der Internalisierung der Partikel wieder erlischt.

7.2.4. Einfluß von 2-Desoxy-D-glukose auf die Chemilumineszenz

Auf Grund der bisherigen Versuche über die Korrelation von Chemilumineszenz und Bakterientötung erscheint es nicht wahrscheinlich, daß die Bakterien bei der Aufnahme durch Makrophagen durch aktiven Sauerstoff bereits eine Vorschädigung erfahren, die für die intrazelluläre Abtötung eine wesentliche Voraussetzung ist. Um diese Frage zu klären haben wir 2-Desoxyglukose verwendet, das die Internalisierung von opsonisierten, aber nicht von unopsonisierten Partikeln durch Makrophagen blockiert (90). Wir hatten gezeigt (Tab. 8), daß dieses Agens nur die intrazelluläre Abtötung von opsonisierten, im Gegensatz zu nicht opsonisierten S.typhimurium hemmt. Nachdem wir noch in Versuchen, die nicht dargestellt sind, gefunden hatten, daß 2-Desoxyglukose auch die Chemilumineszenz von Makrophagen, ausgelöst durch Kontakt mit Bakterien, unterdrücken kann, bot sich damit die Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen Chemilumineszenz der Makrophagen und intrazellulärer Abtötung der Bakterien direkt zu überprüfen. Wir haben dazu die Chemilumineszenz-Respons normaler Makrophagen auf opsonisierte und nicht opsonisierte avirulente S.typhimurium SF10223 in Gegenwart und Abwesenheit von 2-Desoxyglukose (50 mM) verglichen.

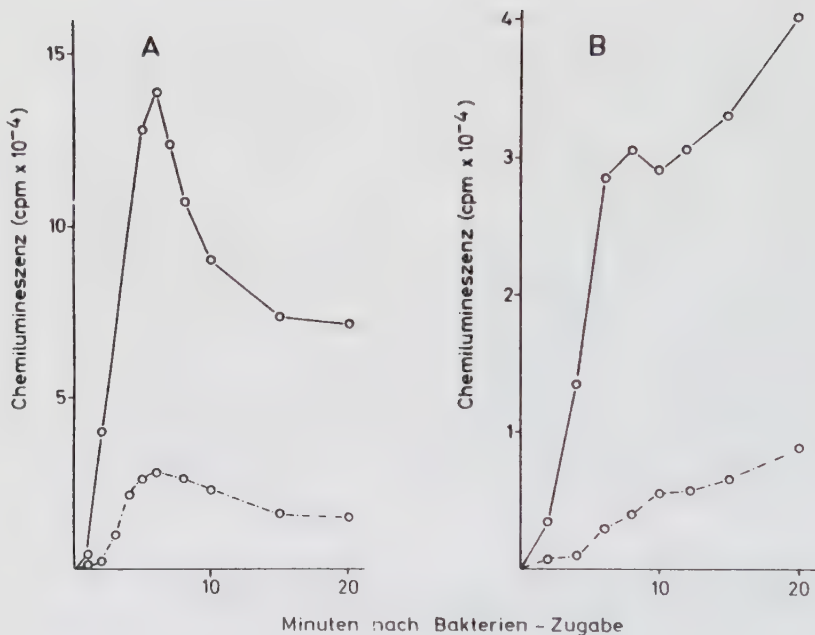


Abb. 27: Einfluß von 2-Desoxy-D-glukose auf die Chemilumineszenz normaler C3Hf-Makrophagen, hervorgerufen durch opsonisierte (A) oder nicht opsonisierte (B) *S. typhimurium* SF 10223. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $2,5 \times 10^6$ mit Normalserum und Antiserum opsonisierte oder $1,2 \times 10^7$ nicht opsonisierte Bakterien zu den Makrophagenkulturen gegeben, denen keine (—) oder 50 mM (- -) 2-Desoxyglukose zugesetzt war. Die Chemilumineszenz wurde im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. Es sind die Mittelwerte von 2 parallelen Ansätzen dargestellt.

Abb. 27 ist zu entnehmen, daß die Chemilumineszenz-Respons auf Zugabe von opsonisierten sowie nicht opsonisierten Bakterien durch 2-Desoxyglukose um ca. 80% gegenüber unbehandelten Makrophagen reduziert ist.

Trotz dieser stark verminderten Chemilumineszenz durch 2-Desoxyglukose ist die intrazelluläre Abtötung nicht opsonisierter S.typhimurium unverändert (siehe Tab. 8). Eine Korrelation zwischen intrazellulärer Bakterizidie und oxidativem Metabolismus, soweit er durch Chemilumineszenz erfaßt werden kann, ist damit nicht zu erkennen.

Bei dem Einfluß von 2-Desoxyglukose auf die Internalisierung von Partikeln und der Chemilumineszenz-Reaktion auf Bakterien durch Makrophagen handelt es sich offensichtlich um verschiedene Wirkungen dieser Verbindung. Während spezifisch nur die Internalisierung von Immunkomplexen über deren Rezeptoren blockiert wird (90), ist die Hemmung der Chemilumineszenz unabhängig von der Opsonisierung der Partikel, welche die Chemilumineszenz der Makrophagen auslösen, und damit vermutlich auch von der chemischen Natur der Rezeptoren auf der Plasmamembran der Makrophagen. Dieser Hemmeffekt ist möglicherweise, trotz der gleichzeitigen Anwesenheit von Glukose im Medium, eine Folge der Störung des Energiestoffwechsels, da 2-Desoxyglukose auch als Inhibitor der Glykolyse bekannt ist (144).

7.2.5. Einfluß von Cytochalasin B auf die Chemilumineszenz

Folgende Befunde ließen einen Zusammenhang von Chemilumineszenz und früher, membrangebundener Abtötung von S.typhimurium durch Makrophagen möglich erscheinen: a.) Die erste Phase der Bakterientötung, die bereits innerhalb fünf Minuten nach Zugabe der Bakterien zu Makrophagen erfolgt, erwies sich als unabhängig von der Virulenz der Salmonellen und der Resistenz der Tiere (siehe Tab. 9). b.) Die Chemilumineszenz-Reaktion der Makrophagen aus diesen Mäusen unterschiedlicher Suszeptibilität auf Stämme von S.typhimurium verschiedener Virulenz ist ebenfalls jeweils gleich (siehe Abb. 23). c.) Die Modellversuche mit Xanthinoxidase in Abschnitt II.5. hatten gezeigt, daß durch aktiven Sauerstoff virulente und avirulente S.typhimurium gleichermaßen geschädigt werden.

Aus Experimenten, deren Ergebnisse in Tab. 10 zusammengefaßt sind, war hervorgegangen, daß Cytochalasin B die erste Phase der Abtötung der Bakterien durch normale Makrophagen nicht hemmt. Unter analogen Bedingungen haben wir daher den Einfluß von Cytochalasin B auf die Che-

milumineszenz der Makrophagen untersucht, die durch Zugabe von S.typhimurium hervorgerufen wird.

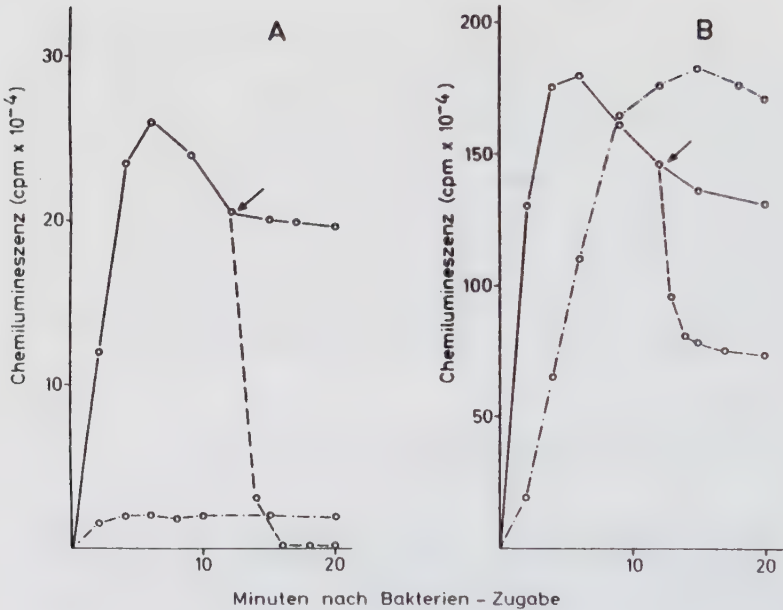


Abb. 28: Einfluß von Cytochalasin B auf die durch S.typhimurium SF10223 hervorgerufene Chemilumineszenz normaler (A) und aktivierter (B) C3Hf-Makrophagen. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden $2,2 \times 10^6$ mit Normalserum opsonisierte Bakterien zu den Makrophagen gegeben, denen kein (—) oder 1 µg/ml Cytochalasin B (- - -) zugesetzt war. Die Chemilumineszenz wurde im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. Die Pfeile zeigen Zugabe von Cytochalasin B nach Bakterienzugabe an (---). Es sind Mittelwerte von 2 parallelen Ansätzen dargestellt.

Abb. 28 A zeigt, daß bei normalen Makrophagen, denen bereits vor Zugabe der Bakterien Cytochalasin B (1 µg/ml) zugefügt wurde, die Chemilumineszenz-Respons unterdrückt wird. Ist Chemilumineszenz bereits im Gange, so fällt sie bei Cytochalasin B-Gabe unmittelbar auf null ab. Die frühe Abtötung der Bakterien durch normale Makrophagen findet also statt, ohne daß diese Chemilumineszenz zeigen.

Auch der Einfluß von Cytochalasin B auf aktivierte Makrophagen (Abb. 28 B) macht deutlich, daß zwischen Chemilumineszenz der Makrophagen und membrangebundener Abtötung der Bakterien kein Zusammenhang besteht. Denn in Tab. 8 hatten wir gezeigt, daß Bakterien die unter Einwirkung von Cytochalasin B nicht internalisiert werden, sondern nur an der Oberfläche der Makrophagen haften bleiben, auch während einer Inkubationszeit von 30 Minuten nicht abgetötet werden. In Abb. 28 B ist aber zu sehen, daß die Chemilumineszenz-Reaktion aktivierter Makrophagen auf S.typhimurium durch Cytochalasin B nur eine zeitliche Verzögerung erfährt, wenn das Agens vor den Bakterien zugesetzt wird. Zugabe von Cytochalasin B nach den Bakterien reduziert die Chemilumineszenz nur auf die Hälfte. Trotz dieser hohen Intensität der Chemilumineszenz, verglichen mit normalen Makrophagen, die auch in Gegenwart von Cytochalasin B auf einen gesteigerten oxidativen Metabolismus schließen läßt, werden aber an der Membran aktivierter Makrophagen gebundene Bakterien nicht abgetötet (siehe Tab. 8).

Cytochalasin B war in DMSO gelöst. So erfolgte mit Zugabe von Cytochalasin B auch eine Zugabe von DMSO in einer Endkonzentration von 0,01%. Kontrollversuche haben gezeigt, daß DMSO bis zu einer Konzentration von 0,1% die Chemilumineszenz nicht beeinflusst. Auf welche Weise Cytochalasin B auf Chemilumineszenz einwirkt, ist nicht bekannt. Chemilumineszenz ist aber ein aktiver Prozeß, bei dem Geschehnisse im Zellinneren beteiligt sind. An der Signalübermittlung sind möglicherweise Mikrofilamente beteiligt, die sensitiv für Cytochalasin B sind (145).

7.3. Einfluß der Opsonisierung der Bakterien auf die Chemilumineszenz der Makrophagen

Die bisher beschriebenen Untersuchungen über die Chemilumineszenz von Makrophagen bei der Interaktion mit S.typhimurium erlauben nur die

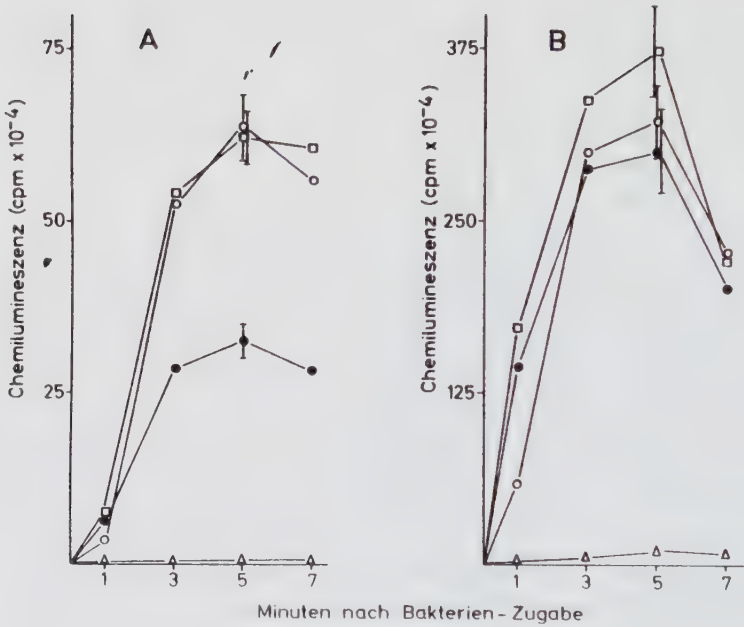


Abb. 29: Einfluß der Opsonisierung von *S.typhimurium* SF10223 auf die Chemilumineszenz bei Interaktion mit normalen (A) und aktivierten (B) Makrophagen aus C3Hf-Mäusen. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen aus normalen oder *S.typhimurium* SF10223-infizierten Tieren wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 3×10^6 nicht opsonisierte (Δ), bzw. mit Normalserum ($\circ$), Antiserum ($\square$) oder Normalserum und Antiserum ($\bullet$) opsonisierte Bakterien zugegeben und die Chemilumineszenz im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. Es sind Mittelwerte ($\pm$ SA) von 3 parallelen Ansätzen dargestellt.

Feststellung, daß es sich bei der Chemilumineszenz um eine Reaktion der Phagozyten auf den Kontakt mit Bakterien handelt. Da das Ausmaß der Assoziation von Bakterien und Makrophagen stark von der Opsonisierung der

Bakterien abhängt (siehe Tab. 3), wollten wir prüfen, wie die Chemilumineszenz der Makrophagen von der Opsonisierung der Salmonellen abhängt. In klinischen Untersuchungen hatte sich die Chemilumineszenz-Messung von humanen Granulozyten als eine empfindliche Methode zur Bestimmung der opsonisierenden Wirkung von Humanserum für E.coli erwiesen (146,147). Dabei wurden aber im wesentlichen die Opsonisierungskapazitäten von Vollserum verschiedener Donoren verglichen. Unser Interesse bestand darin, wie auch bei der Untersuchung der Makrophagen-Bakterien-Assoziation, den Einfluß der Opsonisierung mit den einzelnen Serumkomponenten (Komplement und Antikörper) auf die Chemilumineszenz zu bestimmen. Wir haben die Untersuchungen mit normalen und aktivierten Makrophagen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 für Makrophagen aus C3Hf-Mäusen dargestellt. Mit Zellen aus C57Bl/6-Mäusen ergab sich das gleiche Bild.

Die Opsonisierung der Bakterien mit Normalserum erhöht die bei normalen und nicht aktivierten Makrophagen hervorgerufene Chemilumineszenz. Die Erhöhung war abhängig von der Serumverdünnung. Wir haben weiter festgestellt, daß die Absorption des Serums mit Bakterien in der Kälte die Chemilumineszenz nicht verändert. Eine Beteiligung von natürlichen Antikörpern an der opsonisierenden Wirkung des Normalserums scheint damit unwahrscheinlich. Wird jedoch Serum verwendet, das 30 Minuten auf 56°C erhitzt war, so ist nur noch eine schwache Steigerung der Chemilumineszenz gegenüber nicht opsonisierten Bakterien zu beobachten. Das bestätigt, daß die opsonisierende Kapazität des Normalserums auf Komplement beruht.

Antiserum waren so gewonnen, daß das Komplement inaktiviert wurde. Serum, die mit dem reduzierenden Agens Dithiotreitol behandelt waren, hatten einen unveränderten Agglutinationstiter. Dies zeigte, daß die spezifisch agglutinierenden Antikörper der IgG-Klasse angehören (68,69). Die Opsonisierung der Bakterien mit diesen Antikörpern erbrachte ebenso eine Steigerung der Chemilumineszenz-Intensität der Makrophagen (Abb. 29). Die Erhöhung war auch hier von der Serumverdünnung abhängig.

Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der Bestimmung der Assoziation lebender Bakterien an Makrophagen, die in Tab. 3 dargestellt sind. Man kann also sagen, daß die Intensität der Chemilumineszenz der Makrophagen ein Maß für die Menge der gebundenen Bakterien und damit Ausdruck der Opsonisierungskapazität von Normal- oder Antiserum ist.

Die kombinierte Opsonisierung mit Komplement und Antikörpern führt bei normalen Makrophagen, im Gegensatz zu aktivierten Makrophagen, jedoch zu einer Verminderung der Chemilumineszenz, obwohl die Experimente mit radioaktiv markierten Bakterien (siehe Tab. 9) gezeigt haben, daß der Anteil der an Makrophagen assoziierten Bakterien nach Opsonisierung mit Normalserum nahezu gleich ist.

7.4. Chemilumineszenz als Kriterium der Makrophagenaktivierung

Wir haben in unserem Infektionsmodell solche Makrophagen als aktiviert bezeichnet, die eine höhere bakterizide Kapazität als normale Makrophagen aufwiesen. Bei den geschilderten Untersuchungen zur Chemilumineszenz-Respons der Makrophagen auf S.typhimurium hat sich gezeigt, daß sich aktivierte Makrophagen durch zwei Kriterien von normalen Makrophagen unterscheiden: a.) Die Intensität der Chemilumineszenz, hervorgerufen durch opsonisierte Bakterien, ist gegenüber der von normalen Makrophagen bis zum 15-fachen erhöht (siehe Abb. 22). b.) Zusätzliche Antikörperopsonisierung der Bakterien zur Opsonisierung mit Normalserum beeinflußt die Chemilumineszenz bei aktivierten Makrophagen nicht (siehe Abb. 29 und 30).

Wir haben unter diesen Gesichtspunkten auch Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen untersucht, die mit dem E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142 infiziert waren. Während Makrophagen aus S.typhimurium SF10223-infizierten Tieren eine erhöhte bakterizide Aktivität aufwiesen (Abb. 10 und 14), war dies jedoch bei Makrophagen aus Hybrid F1142-infizierten C57Bl/6-Mäusen nicht der Fall (Tab. 5). In Abb. 27 C ist zu sehen, daß sich diese Makrophagen bezüglich beider Kriterien auch wie normale Makrophagen verhalten.

Als Ursache für die verstärkte Chemilumineszenz aktivierter Makrophagen kann wohl der in vieler Hinsicht erhöhte Stoffwechsel dieser Zellen (49) angesehen werden.

Im Abschnitt II.3.3. konnten wir zeigen, daß Opsonisierung der Bakterien mit Antiserum zusätzlich zur Opsonisierung mit Normalserum deren Internalisierung durch normale Makrophagen beschleunigt. Daraus kann

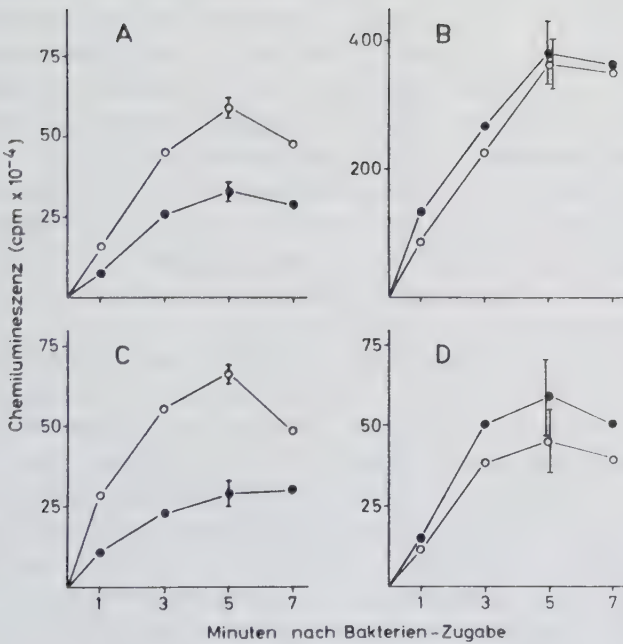


Abb. 30: Einfluß der Opsonisierung von *S.typhimurium* SF1826 auf die Chemilumineszenz bei Interaktion mit normalen Makrophagen (A), aktivierten Makrophagen aus Tieren 18 Tage nach Infektion mit SF10223 (B), Makrophagen aus Tieren 6 Tage nach Infektion mit *E.coli*-*S.typhimurium*-Hybrid F1142 (C) und Makrophagen aus Tieren 5 Tage nach Injektion von Thioglykollat-Medium (D). Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen (A-C), bzw. 10^6 Peritonealzellen (D) aus C57Bl/6-Mäusen wurden in Packard-Gläsern eingesetzt. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 3×10^6 Bakterien zugegeben, die mit Normalserum (○) oder mit Normal- und Antiserum (●) opsonisiert waren. Die Chemilumineszenz wurde im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt. Es sind Mittelwerte ($\pm$ SA) von 3 parallelen Ansätzen angegeben.

man schließen, daß sich unter diesen Bedingungen, durch eine kürzere Verweildauer der Bakterien an der Plasmamembran der Makrophagen, die Intensität der Chemilumineszenz vermindert. Daß dieser Effekt mit aktivierten Makrophagen nicht zu beobachten ist, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß diese Zellen infolge ihrer allgemein erhöhten Phagozytosebereitschaft (49,58) Bakterien unabhängig von ihrer Opsonisierung aufnehmen, sobald sie nur an die Plasmamembran gebunden sind.

Um diese Hypothese zu überprüfen, haben wir mit Thioglykollat-Medium induzierte Makrophagen untersucht, über die detaillierte Phagozytosestudien vorliegen (63). Mit Thioglykollat induzierte Makrophagen erhält man durch intraperitoneale Injektion von Thioglykollat-Medium (V.6.3.). Dabei steigt durch Einwanderung neugebildeter Zellen aus dem Knochenmark die Zahl mononuklearer Phagozyten im Peritoneum nach 3 bis 4 Tagen stark an (148). Untersuchungen von Bianco et al. (63) über die Internalisierung opsonisierter Erythrozyten haben ergeben, daß durch Thioglykollat-Stimulierung eine Änderung der Funktion des Komplement (C)-Rezeptors der Makrophagen eintritt. Während bei normalen Makrophagen das Signal zur Internalisierung von Immunkomplexen nur durch den Fc-Rezeptor gegeben wird und die Funktion des C-Rezeptors auf die Bindung von Partikeln beschränkt ist, kann bei Thioglykollat-induzierten Makrophagen der C-Rezeptor beide Funktionen erfüllen. Wir konnten zeigen, daß die Chemilumineszenz-Reaktion solcher Makrophagen auf Bakterien unabhängig davon ist, ob diese nur mit Komplement oder noch zusätzlich mit Antikörpern opsonisiert sind (Abb. 30 D). Dieses Ergebnis bestätigt die oben aufgestellte Hypothese, daß bei aktivierten Makrophagen die Internalisierung membrangebundener Bakterien unabhängig von der Art ihrer Opsonisierung erfolgt und sich infolgedessen keine Unterschiede in der Chemilumineszenz ergeben.

Die Intensität der Chemilumineszenz Thioglykollat-stimulierter Makrophagen ist mit der normaler Zellen vergleichbar. Es ist aber bekannt, daß diese Makrophagen gegenüber normalen Makrophagen in vielerlei Hinsicht erhöhte oder neue Aktivitäten zeigen, wie z.B. eine schnellere Ausbreitung an Oberflächen (149), verstärkte Phagozytose (63) und Synthese wie auch Sekretion neutraler Proteasen (150). Das sind auch Eigenschaften aktivierter Makrophagen. Wir haben aber gefunden, daß sich mit Thioglykollat induzierte Makrophagen in bezug auf Bakterientötung wie normale Makrophagen

verhalten. So war mit Thioglykollat-Medium in C57Bl/6-Mäusen induzierten Makrophagen der Anteil der an Makrophagen assoziierten überlebenden virulenten S.typhimurium SF1826 nach 30 Minuten 113% gegenüber 110% mit normalen Makrophagen. Damit stimmt überein, daß mit Thioglykollat induzierte Makrophagen auch noch keine erhöhte tumorizide Aktivität entfalten (151). Demnach stellen mit Thioglykollat stimulierte Makrophagen bezüglich der Aktivierung eine Zwischenstufe zwischen normalen und aktivierten Makrophagen dar. Dieser Tatbestand kommt auch in der Chemilumineszenz-Respons dieser stimulierten Makrophagen auf opsonisierte Bakterien zum Ausdruck.

7.5. Chemilumineszenz-Untersuchungen mit toten Bakterien

Da uns die Chemilumineszenz-Respons der Makrophagen vor allem im Zusammenhang mit der Bakterientötung interessierte, war es naheliegend, auch die Reaktion der Phagozyten auf tote Bakterien zu untersuchen.

Abb. 31 zeigt die Reaktion von C57Bl/6-Makrophagen auf UV-getötete S.typhimurium SF1826. Bei der Interaktion von Bakterien mit Peritonealzellen in einem Verhältnis von 2 : 1, die bei lebenden, mit Normalserum opsonisierten, Bakterien zu Chemilumineszenz-Maxima von ca. 10^6 cpm führt, ist mit toten Bakterien nur eine schwache Chemilumineszenz-Reaktion zu beobachten. Das ist unabhängig davon, ob die Bakterien durch UV-Bestrahlung oder durch Hitzebehandlung abgetötet waren. Ein potenzierender Effekt auf die Chemilumineszenz der Makrophagen durch Opsonisierung der Bakterien ist nur sehr schwach ausgeprägt. Reaktion mit Antikörpern wird aber durch Agglutination angezeigt. Bei zehnfacher Erhöhung der Zahl an toten Bakterien ist die Intensität der Chemilumineszenz erhöht, ergibt allerdings immer noch erst etwa 10% der mit lebenden Bakterien erzielten. Auch bei Interaktion von aktivierten Makrophagen mit Bakterien ist gegenüber normalen Makrophagen nur eine ca. zweifach erhöhte Intensität zu erreichen. Mit toten Bakterien des avirulenten S.typhimurium SF10223 und mit Makrophagen aus infektoresistenten C3Hf-Mäusen wurden die gleichen Ergebnisse erzielt.

Das war unerwartet, denn andere Autoren (135,140) hatten mit toten Bakterien und Zymosan ausgeprägte Chemilumineszenz-Reaktionen von

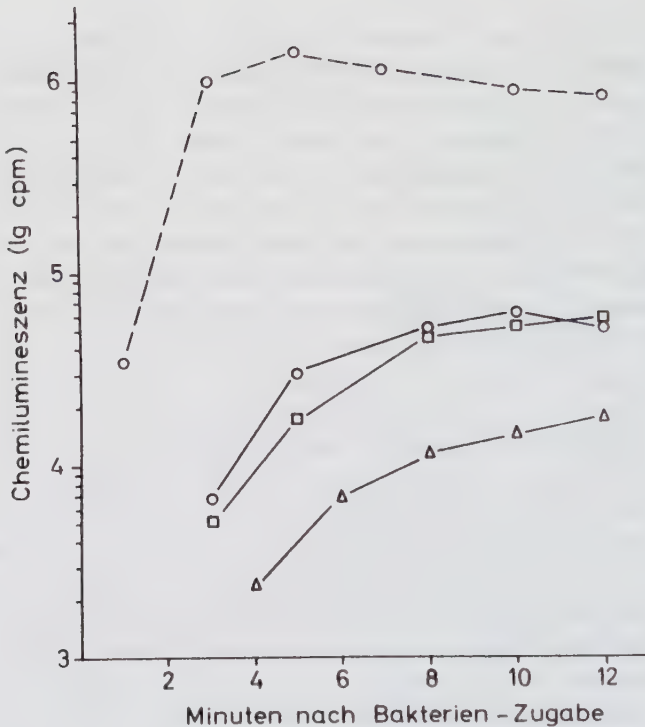


Abb. 31: Chemilumineszenz-Respons von normalen C57Bl/6-Makrophagen auf UV-getötete (---) und lebende (—) *S.typhimurium* SF1826. Jeweils 3×10^6 Peritonealzellen wurden in Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden 7×10^6 nicht opsonisierte (Δ), mit Normalserum (o) oder mit Antiserum ($\square$) opsonisierte Bakterien zugegeben und die Chemilumineszenz im Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät verfolgt.

Phagozyten erhalten. Jedoch betrug bei diesen Untersuchungen die zuge-setzte Partikelzahl ein Mehrhundertfaches der Phagozytenzahl und ist von daher nicht mit unseren Experimenten zu vergleichen. Die Tatsache,

daß zum Erreichen der in unserem System erhaltenen Chemilumineszenz-Intensität mehr tote als lebende Bakterien nötig sind, kann folgendermaßen interpretiert werden: a.) Die Bindung toter Bakterien an Makrophagen ist niedriger, die Chemilumineszenz-Respons aber normal. b.) Die Bindung ist normal, aber die Bakterien sind nicht nur inerte Auslöser der Chemilumineszenz, sondern der bakterielle Stoffwechsel ist für ein Zustandekommen der Chemilumineszenz nötig.

Um die Bindung toter Bakterien an Makrophagen zu bestimmen, haben wir radioaktiv markierte UV-getötete Bakterien eingesetzt. Nach 5 Minuten Inkubation mit Makrophagen wurde der Anteil der an Makrophagen assoziierten Bakterien über Radioaktivitätsmessung ermittelt. Die Versuche ergaben eine schwächere Bindung toter Bakterien (0,04% - 0,07%) als lebender Bakterien (3% - 4%) an Makrophagen. Eine geringere Bindung hitzegetöteter Bakterien ist auch an HeLa-Zellen (152) und Granulozyten (153) beschrieben worden.

Damit hat sich die Problematik der schwachen Chemilumineszenz, die durch tote Bakterien bei Makrophagen ausgelöst wird, auf die Frage verlagert, warum tote S.typhimurium so sehr viel schlechter als lebende an Makrophagen binden. Diese Frage sollte weiter untersucht werden, da dadurch eventuell Aufschlüsse über die Beteiligung von Faktoren wie Chemotaxis oder Stoffwechsel der Bakterien bei der Interaktion mit Phagozyten erhalten werden können.

III. Diskussion

1. Rolle der Makrophagen in der natürlichen Resistenz und der erworbenen Immunität

Die unterschiedliche Resistenz verschiedener Mäuseinzuchtstämme gegen S.typhimurium ist genetisch fixiert (36,37,154). Um die Bedeutung der Makrophagen in der Infektabwehr ermessen zu können, haben wir eine in vitro Technik entwickelt, mit der es möglich ist, Phagozytose und Abtötung von S.typhimurium durch Peritonealmakrophagen zu bestimmen. Wir haben gefunden, daß eine Korrelation besteht zwischen der unterschiedlichen Infektsresistenz von normalen C3Hf- und C57Bl/6-Mäusen und der Fähigkeit ihrer Makrophagen, S.typhimurium verschiedener Virulenz intrazellulär in vitro abzutöten. Die Bakterien binden dabei unabhängig von ihrer Virulenz an die Makrophagen.

Durch Untersuchungen von v.Jeney (54) war für das von uns verwendete Infektionsmodell bekannt, daß die Vermehrungsrate von S.typhimurium in der Milz um so größer war, je virulenter die Bakterien für den betreffenden Mäusestamm sind. Die direkte Auswirkung der bakteriziden Aktivität der Makrophagen im Infektionsgeschehen in vivo ist also in der Verminderung der Vermehrungsgeschwindigkeit der pathogenen Keime in den befallenen Organen des Wirts zu sehen. Bei der Salmonellose der Maus tritt bei einer Konzentration von 10^8 - 10^9 Bakterien pro Milz der Tod der Tiere ein (16,54). Zinkernagel (53) konnte beobachten, daß weitgehend unabhängig von der anfänglichen Infektionsdosis ein relativ hoher Bakterientiter in der Milz nötig ist, um Immunmechanismen auszulösen, die das Wachstum der Keime unter Kontrolle bringen. Es hängt also im wesentlichen von der, wenn auch begrenzten Abtötungskapazität normaler Makrophagen ab, ob in der Zeitspanne zwischen Erreichen des stimulierenden Bakterientiters und vor dem Eintreten der tödlichen Keimbelastung eine Ausbildung der Immunabwehr möglich ist.

Wie unsere Versuche gezeigt haben, besteht ein erfolgreicher Abwehrmechanismus gegen Mäusetyphus in einer Steigerung der bakteriziden Aktivität der Makrophagen. Die Abnahme der Keimzahl in Milz und Peritoneum nach 7 - 10 Tagen war gekoppelt mit dem Auftreten aktivierter Makropha-

gen, die avirulente und virulente S.typhimurium schneller und besser abtöten als normale Makrophagen. Von früheren Arbeiten an diesem Infektionsmodell war bereits bekannt, daß die Tiere nach Infektion mit lebenden avirulenten S.typhimurium von der gleichen Zeit an immun waren (54).

Während bei unseren in vitro Versuchen mit aktivierten Makrophagen ca. 20% der an Makrophagen assoziierten Bakterien überlebten, waren es bei Untersuchungen von Blanden et al. (46) in einem in vivo Phagozytose-System nur 3%. Möglicherweise ist bei der von uns angewendeten Technik die Zahl der an aktivierte Makrophagen assoziierten Bakterien durch früh einsetzende Abtötung zu niedrig gemessen. Diese Frage kann durch die Verwendung radioaktiv markierter Bakterien geklärt werden.

Eine Rolle humoraler Antikörper in der Abwehr einer Primärinfektion scheint uns von untergeordneter Bedeutung, denn in unserem Infektionsmodell setzt eine meßbare Bildung von Antikörpern (54) erst nach der Aktivierung der Makrophagen ein. Bei aktivierten Makrophagen konnten wir aber keinen Einfluß von Antiseren auf Bindung und Abtötung der Bakterien beobachten.

Die Effektivität einer rein humoralen Immunantwort bei Belastung mit virulenten S.typhimurium konnten wir mit C57Bl/6-Mäusen nach Infektion mit dem E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142 testen, da diese Mäuse auf die Infektion mit den Hybrid-Bakterien nur mit der Bildung von Antikörpern, aber nicht mit der Aktivierung von Makrophagen reagierten. Das Ergebnis der Belastung war, daß alle mit Hybrid-Bakterien immunisierten Mäuse starben, nur ihre mittlere Überlebensdauer war gegenüber nicht immunisierten Kontrollen etwas größer. Das ist in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen zahlreicher Autoren, daß in Tieren, die nach Vakzinierung nur eine humorale Immunantwort entwickelt hatten (19,61,155,156), oder in passiv mit Antiserum immunisierten Tieren (19,157) nur in den ersten Tagen der Infektion entweder die Vermehrung von Belastungskeimen verzögert war oder eine Abnahme der Keimzahl erfolgte. Danach setzte aber, wie in unbehandelten Kontrolltieren, eine Zunahme der Bakterien in Milz und Leber ein. Die Ursache dieser Befunde ist nach unseren in vitro Untersuchungen darin zu sehen, daß wahrscheinlich die membrangebundene Abtötung von Bakterien, die mit Antiserum opsonisiert sind, durch normale Makrophagen erhöht ist. Danach vermehren sich jedoch die überlebenden Bakterien intrazellulär wie solche, die mit Normalserum opsonisiert waren. Das erklärt auch die Beobachtungen von Gelzer und Suter (39), die festgestellt hatten, daß sich

virulente S.typhimurium unabhängig von der Opsonisierung in Makrophagen vermehren. Eine Schädigung der Makrophagen durch die intrazelluläre Vermehrung von Bakterien, die mit Antikörpern opsonisiert waren, trat aber verzögert ein.

Über die Funktion von zellvermittelter und humoraler Immunität gegen Mäusetyphus ergibt sich somit folgender Zusammenhang. Nach dem Abklingen einer Infektion und der Entwicklung einer Immunität ist die bakterizide Aktivität der Makrophagen gleich der von normalen Makrophagen; aber es zirkulieren humorale Antikörper. Bei einer Reinfektion besteht der wohl entscheidende Parameter der Immunreaktion darin, wie schnell der sensibilisierte Wirt seine Makrophagen aktivieren kann (158), bevor die letale Keimbelastung erreicht ist. Wir nehmen an, daß die humorale Immunität vor allem in dieser Phase zur Immunabwehr beiträgt, indem durch Agglutination der Bakterien ihre schnellere Bindung an Makrophagen erreicht wird und zudem die bakterizide Kapazität der in ihrer Aktivität noch normalen Makrophagen etwas erhöht wird. Dadurch wird eine Erniedrigung der Infektionsdosis erzielt. Die Bewältigung und Eliminierung der Infektion erfolgt durch aktivierte Makrophagen, welche anscheinend keiner Unterstützung durch Antikörper mehr bedarf.

2. Untersuchungen zur bakteriziden Aktivität der Makrophagen

Durch den Einsatz radioaktiv markierter Bakterien und Hemmstoffen der Phagozytose (Cytochalasin B und 2-Desoxyglukose) gelang es uns zu demonstrieren, daß die Abtötung von S.typhimurium durch Makrophagen nicht nur, wie bisher allgemein angenommen, intrazellulär stattfindet, sondern schon nach Bindung der Bakterien an die Plasmamembran der Makrophagen einsetzt. Während die membrangebundene Abtötung unabhängig von der Virulenz der Bakterien und der Herkunft der Makrophagen erfolgt, spiegelt die Fähigkeit zur intrazellulären Bakterizidie die Resistenz der Tiere gegenüber den verschiedenen Keimen wider.

In der Untersuchung der bakteriziden Mechanismen haben wir uns auf den oxidativen Metabolismus der Makrophagen konzentriert. Vor allem über Granulozyten liegt eine Fülle von Daten vor, die auf die Erzeugung aktiven Sauerstoffs als potentiellen bakteriziden Mechanismus dieser Zellen hin-

weisen (110,111,114,117), der durch lysosomale Myeloperoxidase noch verstärkt werden kann (110,159). Daß auch mononukleare Phagozyten auf Kontakt mit Partikeln und Immunkomplexen mit der Bildung der verschiedenen reaktiven Sauerstoff-Spezies reagieren, ist bereits nachgewiesen worden (118,120,121).

Wir konnten mit einem zellfreien Xanthinoxidase-System zeigen, daß die verwendeten Stämme von S.typhimurium durch aktiven Sauerstoff geschädigt werden. Das geschah unabhängig von der Virulenz der Bakterien und stimmte insofern mit der membrangebundenen Abtötung der Makrophagen überein. Wir hatten dabei die Bedingungen im zellfreien System so gewählt, daß sie möglichst den Verhältnissen mit intakten Phagozyten gleich kamen. Dazu haben wir den Enzymansatz so gestaltet, daß die erzeugte Intensität der Chemilumineszenz mit der von Makrophagen nach Bakterienzugabe übereinstimmte.

Weil sich Chemilumineszenz von Granulozyten (105,111,135,136,137) und Monozyten (119,139,140), hervorgerufen durch Interaktion mit Partikeln, als Indikator für den oxidativen Metabolismus erwiesen hatte, haben wir untersucht, ob wir über die Messung der Chemilumineszenz einen Zusammenhang zwischen dem oxidativen Metabolismus der Makrophagen und der Bakterientötung feststellen können.

Das Erlöschen der Chemilumineszenz nach dem Entfernen freier Bakterien hat gezeigt, daß Chemilumineszenz nur während der Phagozytose-Phase meßbar ist. Deshalb lag vor allem die Untersuchung über eine Beteiligung von aktivem Sauerstoff bei der membrangebundenen Bakterientötung nahe. Wir konnten zeigen, daß Cytochalasin B, das die membrangebundene Abtötung nicht hemmt, die Chemilumineszenz-Respons normaler Makrophagen aber vollkommen blockiert. Chemilumineszenz kann somit nicht mit der membrangebundenen Bakterientötung in Verbindung gebracht werden. Daraus kann noch nicht der Schluß gezogen werden, daß deshalb oxidative Prozesse überhaupt nicht an der membrangebundenen Bakterizidie beteiligt sind. Man muß in Betracht ziehen, daß nicht jeder oxidative Metabolismus mit Chemilumineszenz gekoppelt ist. Über den Einfluß von Cytochalasin B auf die Bildung der verschiedenen aktiven Sauerstoff-Metaboliten sind uns keine Untersuchungen bekannt.

Bei der Interaktion von Partikeln und Immunkomplexen mit Membranrezeptoren von Makrophagen erfolgt eine erhöhte Sekretion lysosomaler

Enzyme (83,160,161,162). Da wir in unseren Versuchen im zellfreien System gerade mit der Kombination von aktivem Sauerstoff und Lysozym einen deutlichen bakteriziden Effekt erzielen konnten, ist in der Kooperation von oxidativen Prozessen und lysosomalen Enzymen ein bakterizider Mechanismus auch an der Membran der Makrophagen zu sehen. Aus Arbeiten mit Granulozyten weiß man, daß Cytochalasin B die Enzymsekretion nicht verhindert (163). Untersuchungen mit Xanthinoxidase-Systemen haben gezeigt, daß es zur Bildung von Peroxysäuren aus ungesättigten Fettsäuren kommt (122) und Permeabilitätsänderungen von Liposomen auftreten (164). Es ist möglich, daß über solche Effekte aktiver Sauerstoff den Angriff lysosomaler Enzyme an der Bakterienoberfläche erleichtert.

Denkbar ist auch, daß lysosomale Enzyme die essentiellen Effektoren der membrangebundenen Bakterientötung darstellen, während aktivem Sauerstoff nur eine unterstützende Funktion zukommt.

Die Chemilumineszenz-Respons der Makrophagen auf Kontakt mit S.typhimurium ist sicher kein direkter Ausdruck der intrazellulären Bakterientötung, was schon durch die unterschiedliche Kinetik dieser beiden Prozesse verdeutlicht wird. Man muß aber in Betracht ziehen, daß oxidative Prozesse bereits an der Plasmamembran der Makrophagen Bakterien eventuell vorschädigen und dadurch die intrazelluläre Abtötung vorbereiten und erleichtern. Einen Ansatz, diese Frage zu klären, bot der Einsatz von 2-Desoxyglukose in der Chemilumineszenz. Dieser Hemmstoff der Phagozytose verhindert nur die Internalisierung opsonisierter Bakterien, reduziert aber auch, wie wir fanden, die Chemilumineszenz. Unsere Untersuchungen zeigten, daß nicht opsonisierte Bakterien in Gegenwart von 2-Desoxyglukose unverändert von Makrophagen intrazellulär abgetötet werden, obwohl die Chemilumineszenz reduziert ist. Es besteht also auch zwischen intrazellulärer Abtötung und Chemilumineszenz keine Korrelation. Trotzdem ist noch nicht auszuschließen, wie im Zusammenhang mit der membrangebundenen Bakterizidie schon festgestellt wurde, daß nicht durch Chemilumineszenz erfäßbare oxidative Prozesse an der intrazellulären Bakterientötung beteiligt sind.

Unsere Versuche machen deutlich, daß zwischen Chemilumineszenz und Abtötung von S.typhimurium durch Makrophagen kein Zusammenhang besteht. Um die Beteiligung aktiven Sauerstoffs bei der Bakterizidie der Makrophagen zu klären, sollten zukünftige Untersuchungen den direkten Nachweis der

verschiedenen Sauerstoff-Metaboliten mit einschließen.

Die Fähigkeit zur intrazellulären Abtötung hat sich als entscheidender Faktor für die natürliche Resistenz der Mäuse gegen S.typhimurium erwiesen. Es stellt sich deshalb die Frage, warum virulente S.typhimurium durch Makrophagen aus infektsensitiven C57B/6-Mäusen nicht intrazellulär abgetötet werden. Auf Grund folgender Untersuchungen nehmen wir an, daß virulente Bakterien ebenso wie avirulente in Makrophagen aus sensitiven C57B/6-Mäusen aufgenommen werden. Wir haben gezeigt, daß die Reduktion der Chemilumineszenz-Intensität auf Kontakt mit Bakterien, die mit Normal- und Antiserum opsonisiert sind, gegenüber Bakterien, die nur mit Normalserum opsonisiert sind, auf die schnellere Internalisierung der mit Antikörper opsonisierten Bakterien zurückzuführen ist. Die Chemilumineszenz-Reaktion der Makrophagen der beiden untersuchten Mäusestämme ist dabei mit virulenten und avirulenten Bakterien gleich. Daraus schließen wir, daß S.typhimurium unabhängig von der Virulenz durch die Makrophagen aufgenommen wird. Es ist auch bekannt, daß gerade die Fähigkeit zur intrazellulären Vermehrung in Makrophagen charakteristisch ist für virulente Salmonellen (39,40).

Die Ursache für die fehlende Abtötung von virulenten S.typhimurium durch Makrophagen aus sensitiven C57B/6-Mäusen vermuten wir deshalb im intrazellulären Geschehen. Folgende Möglichkeiten sollten bei zukünftigen Untersuchungen überprüft werden. Phagosomen, die virulente S.typhimurium enthalten, verschmelzen nicht mit Lysosomen, wodurch der Kontakt mit lysosomalen Enzymen vermieden wird. Dieses Phänomen ist bei Mäuse-Makrophagen für verschiedene virulente Mycobakterien bekannt (165,166). Oder, eine Bildung von Phagolysosomen erfolgt zwar, aber die Bakterien werden trotzdem nicht abgetötet. Vergleichende biochemische Untersuchungen der Lysosomen der Makrophagen aus den beiden verwendeten Mäusestämmen sollten dann Aufschluß geben über die entscheidenden resistenzvermittelnden bakteriziden Mechanismen der Makrophagen.

IV. Zusammenfassung

Die Infektion von relativ resistenten C3Hf-Mäusen und sensitiven C57Bl/6-Mäusen mit virulenten Salmonella typhimurium (SF1826) und avirulenten S.typhimurium (SF10223) diente uns als Modellinfektion für typhöse Salmonellose. Wir haben die Rolle der Makrophagen als Effektorzellen untersucht. Zur Phagozytose und Abtötung der Bakterien in vitro wurden Peritonealmakrophagen verwendet.

Wir haben gefunden, daß sich die natürliche Resistenz dieser Mäuse in der bakteriziden Kapazität ihrer Makrophagen, S.typhimurium intrazellulär abzutöten, widerspiegelt. Virulente und avirulente Bakterien werden durch Makrophagen aus infektoresistenten C3Hf-Mäusen nahezu gleichermaßen abgetötet. Makrophagen aus sensitiven C57Bl/6-Mäusen töten dagegen nur avirulente Bakterien in einem C3Hf-Makrophagen vergleichbarem Maß ab, während sich virulente Bakterien in den Makrophagen vermehren. Auch nach Opsonisierung mit Antiserum war keine intrazelluläre Abtötung virulenter S.typhimurium durch C57Bl/6-Makrophagen zu beobachten.

Nach intraperitonealer Infektion beider Mäusestämme mit einer sublethalen Dosis avirulenter S.typhimurium stoppte die Vermehrung der Keime in Milz und Peritoneum, sobald eine erhöhte bakterizide Aktivität der Makrophagen auch in vitro nachzuweisen war. Die so aktivierten Makrophagen aus beiden Mäusestämmen töten sowohl avirulente, als auch virulente S.typhimurium, unabhängig von der Opsonisierung, schneller und in einem größeren Ausmaß ab als normale Makrophagen.

Die intraperitoneale Injektion lebender E.coli-S.typhimurium-Hybride (F1142) führte in C3Hf-Mäusen, nicht aber in C57Bl/6-Mäusen, zur Makrophagenaktivierung. Die Persistenz dieser Keime in Milz und Peritoneum sowie die humorale Immunantwort, gemessen als Bakterienagglutination, war in beiden Mäusestämmen gleich. Nur C3Hf-Mäuse zeigten jedoch einen Infektionsschutz 10 und 40 Tage nach Immunisierung gegen eine Belastung mit der 180-fachen LD₅₀ des virulenten SF1826-Stammes.

Der Einsatz radioaktiv markierter Bakterien erlaubte eine Differenzierung des bakteriziden Geschehens. Sofort nach Assoziation der Bakterien an normale Makrophagen werden, unabhängig von der Resistenz der Tiere, ca. 40% sowohl virulenter als auch avirulenter Bakterien abgetötet. Diese Abtötung findet an der Plasmamembran der Makrophagen statt, ohne daß eine

Internalisierung der Bakterien eintritt, denn die Abtötung wird durch das antiphagozytäre Agens Cytochalasin B nicht beeinträchtigt. In einem anschließenden Cytochalasin B empfindlichen Schritt werden die Bakterien aufgenommen und intrazellulär abgetötet. Im Gegensatz zur membrangebundenen, extrazellulären Bakterizidie erfolgt die intrazelluläre Abtötung in Abhängigkeit von der Virulenz der Bakterien und der Herkunft der Makrophagen. Opsonisierung der Bakterien mit IgG-Antikörpern beschleunigt die Internalisierung und erhöht die Abtötung der Bakterien.

Die Tötung der Bakterien kann in vitro durch Lysozym und aktiven Sauerstoff, der durch ein zellfreies Xanthinoxidase-System erzeugt wird, imitiert werden. Avirulente S.typhimurium werden dabei stärker abgetötet als virulente. Aktiver Sauerstoff allein schädigt beide Bakterienstämme im gleichen Maß reversibel.

Auf Kontakt mit S.typhimurium reagieren die Makrophagen mit einer Luminol-abhängigen Chemilumineszenz. Die Chemilumineszenz-Reaktion der Makrophagen korreliert weder mit der membrangebundenen noch mit der intrazellulären Abtötung der Bakterien. Die Chemilumineszenz ist jedoch ein Maß für die Bindung von Bakterien an Makrophagen und damit auch Ausdruck opsonisierender Wirkung von Normal- oder Antiserum. Optimale Opsonisierung mit Normal- und Antiserum führt, verglichen mit Bakterien, die nur mit Normal- oder Antiserum opsonisiert sind, zu einer Reduktion der Chemilumineszenz-Intensität normaler Makrophagen.

Aktiviert Makrophagen unterscheiden sich in ihrer Chemilumineszenz-Reaktion auf opsonisierte Bakterien von normalen Makrophagen durch zwei Kriterien: a.) Die Intensität der Chemilumineszenz aktivierter Makrophagen ist bis zu 15-fach stärker. b.) Eine zusätzliche Antikörperopsonisierung zur Opsonisierung mit Normalserum hat bei aktivierten Makrophagen keinen Einfluß auf die Chemilumineszenz.

Der Interaktion von Bakterien und Makrophagen liegen aktive Prozesse zugrunde, denn tote Bakterien attachieren, unbeeinflusst von der Opsonisierung, viel schlechter an Makrophagen und rufen nur eine sehr geringe Chemilumineszenz hervor.

Untersuchungen zu potentiellen Virulenzfaktoren der verwendeten Salmonella-Stämme ergaben: a.) Die Bakterien besitzen, unabhängig von der Virulenz, gleiche Aktivität an Superoxid-Dismutase. b.) Das durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erhaltene Proteinmuster der äußeren Membran

virulenter und avirulenter S.typhimurium weist Unterschiede in den Nebenmembranproteinen auf.

V. Material und Methoden

1. Kulturmedien und Puffer

1.1. Bakteriologische Nährmedien

Standard I - Nährbouillon (Merck):

Spezialpepton	15,6 g	NaCl	5,6 g
Hefeextrakt	2,8 g	Aqua dest. ad 1000 ml	
D(+)-Glukose	1,0 g	pH 7,4 - 7,6	

A 3-Medium:

Bacto-Fleischextrakt	1,5 g	NaCl	3,50 g
Bacto-Hefeextrakt	1,5 g	Na ₂ HPO ₄	3,68 g
Bacto-Pepton	5,0 g	NaH ₂ PO ₄	1,36 g
Bacto-Dextrose	1,0 g	Aqua dest. ad 1000 ml	

Loeb-Agar (167):

Bacto-Tryptose	10 g	Glukose	1 g
Bacto-Hefeextrakt	1 g	NaCl	8 g
Bacto-Agar	15 g	Aqua dest. ad 1000 ml	

pH auf 7,1 mit 4% NaOH eingestellt.

10 ml 0,25 M CaCl₂ wurde nach dem Autoklavieren zugegeben.

D_{1,5}-Agar (168):

Kaseinpepton	15 g	Glukose	3 g
Hefeextrakt	5 g	NaCl	3 g
Fleischextrakt	5 g	NaH ₂ PO ₄ × 12H ₂ O	2,3 g
Bacto-Agar	15 g	Leitungswasser ad 1000 ml	

pH auf 7,3 mit 4% NaOH eingestellt.

Eier-Nährboden (9):

3 Teile Ei (Eiweiß + Eigelb) und 1 Teil 0,85% NaCl-Lösung.

In Reagenzgläser je 5 ml abfüllen und in Schräglage im Heißluftsterilisator bei 85°C sterilisieren; am 1. Tag 2 Stunden, am 2. Tag 1 Stunde.

1.2. Zellkulturmedien

Eagle's-Medium in der Modifikation von Dulbecco (169) wurde mit 3,7 g NaHCO_2/l (Eagle's-Medium) zur Kultivierung von Zellen im CO_2 -begasten Brutschrank gepuffert. Für sonstige Inkubationen wurde das Medium mit 20 mM Hepes (Roth) gepuffert (Eagle's + Hepes-Medium). Nur Eagle's-Medium wurde Phenolrot zugesetzt. Antibiotikahaltige Medien waren mit Dehydrostreptomycin (Hoechst) 100 $\mu\text{g/ml}$ und Penicillin (Grünenthal) 100 I.E./ml versetzt. Den Medien wurde kein Serum zugegeben. Sterilisation erfolgte durch Sterilfiltration durch Seitzfilter (Schleicher + Schüll).

1.3. Puffer

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl	8,00 g	$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
KaCl	0,20 g	CaCl_2	0,1 g
Na_2HPO_4	1,15 g	Aqua dest.ad	1000 ml
KH_2PO_4	0,2 g	pH 7,2	

Sterilisation durch Filtration.

2. Bakterien

2.1. Bakterienstämme

Salmonella typhimurium SF1826 ist ein prototropher mäusevirulenter Glattstamm mit den O-Faktoren 4, 5, 12.

Salmonella typhimurium SF10223 ist eine durch Spontanmutation aus Stamm SF1826 entstandene genetisch stabile Variante. Es ist ebenfalls eine prototrophe Glattform mit den O-Faktoren 4, 5 und 12, aber deutlich reduzierter Virulenz für Mäuse (54).

Escherichia coli 08 (F492) ist eine prototrophe Glattform.

E.coli-S.typhimurium-Hybrid F1142 mit den O-Antigenfaktoren 4, 5, 12 wurde durch Übertragung der genetischen Information für die O-Antigensynthese von S.typhimurium auf E.coli 08 hergestellt (62).

2.2. Stammhaltung

Die verwendeten Bakterienstämme wurden als langfristige Stammkulturen auf Eier-Nährböden bei Zimmertemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Zur Anzucht wurde in Bouillon überimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Der Nachweis der serologischen Spezifität erfolgte durch Phagentypisierung. Die Virulenz der Salmonella-Stämme wurde durch Infektion sensibler C57Bl/6-Mäuse kontrolliert. Als kurzfristige Stammkulturen dienten Ausstriche auf D_{1,5}-Agar. Diese wurden bei 4°C aufbewahrt und in Abständen von 3 - 4 Wochen transferiert. Alle 2 - 3 Monate wurden neu von Stammkulturen auf Eier-Nährböden abgeimpft und angezüchtet.

2.3. Züchtung der Bakterien

Von Ausstrichen auf D_{1,5}-Agar wurde Nährbouillon beimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Übernachtskultur wurde, soweit nicht anders angegeben, 1 : 10 in frische Nährbouillon (in der Regel 4,5 ml in Reagenzglaschen) verdünnt und 2 Stunden als Standkultur bei 37°C bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase inkubiert ($4 - 5 \times 10^8$ lebende Bakterien/ml). Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Sorvall; 20 Minuten, 8000 x g), einmal mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert.

2.4. ³H-Thymidinmarkierung von Bakterien

Es wurden Sorvall-Zentrifugenröhrchen mit je 2,25 ml Nährbouillon, welche 1mM Adenosin (Sigma) enthielt, auf 37°C vorgewärmt, mit 0,25 ml einer Übernachtskultur beimpft und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 250 µCi Methyl-³H-Thymidin (The Radiochemical Centre, Amersham; 1 mCi/ml wässriger Lösung, ca. 18Ci/mMol) zugegeben und die Inkubation für weitere 2 Stunden fortgesetzt. Adenosin hemmt die Thymidinphosphorylase, wodurch der Einbau von ³H-Thymidin verbessert wird (170). Die markierten Bakterien wurden 20 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert, dreimal mit einer Lösung von 1mM kaltem Thymidin (Boehringer) in PBS gewaschen. Die erzielte Markierung lag bei ca. 8000 cpm/10⁶ Bakterien. Bei Aufbewahrung

bei 0°C in PBS änderte sich die Lebendzellzahl (Kolonienbildung) dieser radioaktiv markierten Bakterien innerhalb 10 Stunden nicht.

2.5. UV-getötete Bakterien

Eine Suspension von 12 ml Bakterien in PBS (ca. 2×10^8 /ml) wurde in Plastik-Petrischalen (Greiner) von 10 cm Durchmesser mit kurzwelligem UV-Licht 30 Minuten bestrahlt, wobei alle 5 Minuten durch Schwenken der Schalen die Suspension durchmischte wurde. Die Abtötung wurde durch Plattieren auf Loeb-Agar geprüft. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Minifuge; 6000 x g, 20 Minuten), zweimal mit PBS gewaschen und die Zelldichte nach Zählung in einer Neubauer-Zählkammer (0,01 mm Tiefe) eingestellt.

2.6. Hitzegetötete Bakterien

Eine Suspension von 5×10^8 Bakterien/ml PBS wurde 30 Minuten bei 80°C im Wasserbad erhitzt, die Bakterien dann abzentrifugiert (Minifuge; 6000 x g, 20 Minuten) und zweimal mit PBS gewaschen. Die gewünschte Zellzahl wurde nach Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer eingestellt.

2.7. Opsonisierung von Bakterien

Die Opsonisierung von Bakterien erfolgte immer direkt vor deren weiteren Verwendung. Lebende und tote oder radioaktiv markierte und unmarkierte Bakterien wurden gleich behandelt. Jeweils frisch aufgetaute Seren wurden verwendet. Bakterien in PBS (5×10^8 /ml) wurden mit 1 : 5 verdünntem Normalserum und/oder 1 : 100 verdünntem Antiserum, dessen reziproker Agglutinationstiter 64 betrug, 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Ein Waschen der opsonisierten Bakteriensuspensionen wurde durch eine mindestens 100-fache Verdünnung ersetzt, da es sich meistens um sehr kleine Volumina von ca. 250 µl handelte. Unter dem Mikroskop wurde jedesmal geprüft, ob auch keine Agglutination der Bakterien eingetreten war.

3. Versuchstiere

3.1. Mäusestämme

Die verwendeten Mäuseinzuchtstämme C3Hf und C57Bl/6 wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen im Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg gezüchtet und bis zu Versuchsbeginn, d.h. bis zu einem Alter von 6 - 10 Wochen, unter SPF-Bedingungen gehalten. Es wurden nur männliche Tiere verwendet.

3.2. Infektion der Mäuse

Infektionen der Mäuse zur Immunisierung als auch zur Belastung erfolgten immer intraperitoneal, wobei die betreffende Bakterienzahl jeweils in 0,2 ml PBS injiziert wurde. Infizierte Tiere wurden in Isolatoren mit eigenem Belüftungssystem gehalten, in welchem im Zu- und Abgang bakteriendichte Filter eingelegt waren.

4. Seren

Sämtliche Seren wurden in entsprechend kleinen Proben eingefroren und erst direkt vor ihrer Verwendung aufgetaut. Seren wurden nicht ein zweites Mal eingefroren.

4.1. Komplementserum

4.1.1. Gewinnung

Nachdem der Kreislauf der Tiere durch Infrarotbestrahlung angeregt war, wurden sie aus der Schwanzarterie in vorgekühlte Eppendorff-Gefäße entblutet (pro Maus ein Gefäß). Die Gerinnung des Blutes erfolgte unter Eiskühlung innerhalb 4 - 6 Stunden, wobei nach einer Stunde und vor dem

Zentrifugieren der Blutkuchen vorsichtig mit einem abgeschmolzenen Glasstab von der Gefäßwand abgelöst wurde. Die weiteren Schritte wurden im Kühlraum mit gekühlten Gefäßen, Pipetten, Spritzen, etc. durchgeführt: Zentrifugation in der Tischzentrifuge, Vereinigung der Serumüberstände und wiederholtes Zentrifugieren bis das Serum frei von Erythrozyten und Fibrin war. Das Serum wurde in kleinen Portionen bei -70°C eingefroren.

4.1.2. Absorption mit Bakterien

Zur Entfernung eventuell vorhandener natürlicher Antikörper gegen S.typhimurium oder E.coli wurden die Komplementseren zum Teil mit den betreffenden Bakterien absorbiert. Dazu wurde zu 1 ml gewonnenem Serum ca. 100 μl sedimentierte UV-getötete Bakterien gegeben, 1 Stunde unter wiederholtem Umrühren im Eis aufbewahrt und danach die Bakterien abzentrifugiert (Sorvall, 8000 $\times$ g, 30 Minuten). Zusätzlich wurde das Serum noch sterilfiltriert (Millipor-Filter 2,2 μ).

4.1.3. Inaktivierung

Zur Inaktivierung des Komplements wurden Seren 30 Minuten im Wasserbad auf 56°C erhitzt.

4.2. Antiseren

4.2.1. Gewinnung

24 oder 40 Tage nach Infektion mit 2×10^3 lebenden S.typhimurium SF10223 wurden die Mäuse aus der Schwanzarterie entblutet, wobei das Blut jeder Maus getrennt zur Gerinnung kam. Dazu wurde das Blut zunächst 3 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 10°C aufbewahrt. Die Komplementaktivität geht dabei verloren. Nach Zentrifugation in der Eppendorff-Zentrifuge wurde das Serum abgehoben und von mehreren Mäusen vereinigt.

4.2.2. Titerbestimmung durch Bakterienagglutination

Das Serum wurde in 1 : 2 Verdünnungsschritten in kleinen Reagenzröhrchen, in denen 50 µl PBS vorgelegt waren, verdünnt. 50 µl einer Suspension von 1×10^9 lebenden Bakterien/ml PBS wurden zu jedem Röhrchen gegeben, die Mischung 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert und der Agglutinationstiter unter dem Mikroskop bestimmt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Antiseren gegen S.typhimurium von C3Hf- und C57Bl/6-Mäusen, 40 Tage nach Infektion gewonnen, ergaben mit Bakterien des virulenten und avirulenten Stammes einen Titer von 1 : 64. Die Seren wurden 1 : 10 in PBS vorverdünnt und in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren. Zur Oponisierung der Bakterien wurden die Seren in einer Endverdünnung von 1 : 100 verwendet. Einmaliges Einfrieren beeinflusst den Titer nicht.

4.2.3. Bestimmung des Dithiotreitol-resistenten Titers

Das Sulfhydrylreagenz Dithiotreitol spaltet IgM in seine Untereinheiten (68), sodaß der verbleibende Titer IgG zugeschrieben werden kann (69). Unverdünntes Antiserum wurde 1 : 2 mit 0,01 M Dithiotreitol in PBS verdünnt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert (68). Danach wurde der Titer, wie unter V.4.2.2. beschrieben, bestimmt. Bei den Salmonella-spezifischen Antiseren, die 40 Tage nach Infektion der Tiere gewonnen waren, blieb durch diese Behandlung der Titer unverändert. Als Positivkontrolle diente Serum aus Tieren 24 Tage nach Infektion. Dithiotreitol reduzierte den Titer dieses Serums um 2 Verdünnungsstufen.

5. Infektions- und Immunisierungsversuche

5.1. Bestimmung der letalen Infektionsdosis

Gruppen von 7 Mäusen wurden jeweils 10^6 , 10^7 , 10^8 lebende E.coli 08 oder E.coli-S.typhimurium-Hybride F1142 pro Maus i.p. injiziert und die Anzahl der toten Tiere alle 2 Tage bis 40 Tage nach der Infektion registriert. Infolge der großen Unterschiede der Infektionsdosen starben oder überlebten

jeweils alle Mäuse einer Gruppe, sodaß angegeben werden konnte, daß die letale Dosis größer ist als die höchste Bakterienmenge, bei der alle Tiere noch überlebten.

5.2. Keimzahlverlauf in infizierten Tieren

5.2.1. Quantitative Bestimmung lebender Bakterien im Peritoneum

Die Mäuse wurden mit Äther narkotisiert, das Fell am Bauch entfernt und 5 ml antibiotikafreies Eagle's-Medium ins Peritoneum gespritzt, der Bauch leicht massiert und das Medium wieder in die Spritze aufgezogen. 4 - 4,5 ml des Mediums konnten wiedergewonnen werden. In Reagenzgläsern wurde das Medium, das auch Peritonealzellen enthielt, 1 Minute im Ultraschallbad beschallt, um die Peritonealzellen zu lysieren. 0,1 ml Aliquots wurden auf Loeb-Agar plattiert und über die erhaltene Kolonienzahl die Anzahl lebender Bakterien pro 5 ml bestimmt.

5.2.2. Quantitative Bestimmung lebender Bakterien in der Milz

Nachdem den Mäusen das Peritoneum durchgespült war (siehe V.5.2.1.), wurde unter sterilen Kautelen die Milz entnommen und in 5 ml PBS mit einem Hochfrequenzhomogenisator (Typ PT 1000, Bachhofer) für 10 Sekunden homogenisiert. Die Zahl der lebenden Bakterien wurde durch Ausplattieren von 0,1 ml oder einer entsprechenden Verdünnung auf Loeb-Agar bestimmt.

5.3. Immunisierungsversuche

Gruppen von 7 Mäusen wurde intraperitoneal je Maus 2×10^3 lebende S.typhimurium SF10223 oder 10^7 E.coli-Hybride F1142 injiziert.

5.3.1. Infektionsbelastung der Mäuse nach Immunisierung

Gruppen von 7 immunisierten Mäusen und 7 nicht immunisierten Kontrolltieren wurde die 180-fache 10^{10}_{90} lebender virulenter *S.typhimurium* 91426 intraperitoneal injiziert und die Todesfälle danach täglich bis zu 40 Tagen nach der Belastung registriert.

6. Gewinnung von Peritonealzellen

6.1. Normale Mäuse

Die Tiere wurden mit Äther getötet, mit 70%igem Alkohol benäht und das Fell am Bauch entfernt. 5,5 ml, in der Regel antibiotikahaltiges, Fagles Medium wurden ins Peritoneum gespritzt, die Bauchdecke leicht massiert und das Medium wieder in die Spritze aufgezogen. 4 - 5 ml Medium konnten wiedergewonnen werden. Es enthielt bei C3Hf-Mäusen ca. $2,4 \times 10^6$ Peritonealzellen und bei C57Bl/6-Mäusen ca. $3,2 \times 10^6$ Peritonealzellen. Trypanblau-Färbung zeigte, daß 90 - 95% dieser Zellen lebten.

6.2. Infizierte Mäuse

Zur Gewinnung aktivierter Makrophagen wurden die Tiere mit 2×10^3 lebenden avirulenten *S.typhimurium* 910223 oder mit 10^7 lebenden *E.coli*-Hybriden F1142 i.p. infiziert. Die Peritonealzellen aus diesen Mäusen wurden wie solche aus Normaltieren erhalten (siehe V.6.1.). $6 - 12 \times 10^6$ Peritonealzellen pro Maus konnten gewonnen werden.

6.3. Mit Thioglykollat-Medium behandelte Mäuse

Thioglykollat-Medium:

3 g Trockenpulver (BBL, Cockeysville) in 100 ml dest. Wasser auflösen, autoklavieren und 1 Tag im Kühlschrank aufbewahren.

2 ml dieses Mediums wurden pro Maus langsam i.p. injiziert. Nach 4 - 6 Tagen (in dieser Zeit wurden die Tiere unter konventionellen Bedingungen gehalten) wurden die Peritonealzellen, wie unter V.6.1. beschrieben, isoliert. Es wurden ca. $1,4 \times 10^7$ Peritonealzellen pro Maus gewonnen.

7. In vitro Untersuchungen mit Makrophagen

7.1. Bindung und Abtötung nicht radioaktiv markierter Bakterien durch Makrophagen

7.1.1. Kulturbedingungen der Makrophagen

7.1.1.1. Peritonealmakrophagen

1×10^6 Peritonealzellen in 2 ml antibiotikahaltigem Eagle's-Medium aus normalen oder infizierten Mäusen wurden in Oberflächen-behandelte Petrischalen ($\varnothing$ 35 mm; Greiner) eingesät. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C im CO_2 -begasten (12% CO_2) Brutschrank (Heraeus) wurde das Medium abdekantiert und nicht adhärente Zellen durch zweimaliges Schwenken mit je 2 ml warmem PBS entfernt. Danach wurden die haftenden Zellen 24 Stunden in 2 ml antibiotikahaltigem Eagle's-Medium weiterinkubiert.

7.1.1.2. Knochenmarkmakrophagen

In vitro differenzierte Knochenmarkmakrophagen (76) wurden von Dr. Lohmann-Matthes zur Verfügung gestellt. 7 Tage alte Kulturen in Petrischalen wurden 10 Minuten auf Eis gestellt, die Zellen durch Abspritzen mit dem Medium von der Oberfläche abgelöst und in nicht Oberflächen-behandelten Plastikzentrifugenbecher (Falcon) 10 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in antibiotikahaltigem Eagle's-Medium resuspendiert. 3×10^5 Knochenmarkmakrophagen wurden in 2 ml Medium in Petrischalen ($\varnothing$ 35 mm) eingesät und 24 Stunden im CO_2 -begasten Brutschrank bei 37°C kultiviert.

Zur Aktivierung von Knochenmarkmakrophagen wurden während der 24-stündigen Inkubation pro Petrischale 50 µl einer MCF-haltigen Überstands (76) zugesetzt.

7.1.2. Bestimmung der Menge adhärrierender Peritonealmakrophagen

Nach der Kultivierungszeit von 24 Stunden wurden die Zellrasen zweimal mit 5 ml kaltem (10°C) PBS abgespritzt.

7.1.2.1. Giemsa-Färbung

Die gewaschenen Zellrasen wurden sofort mit dem Fön getrocknet, 5 Minuten mit Methanol fixiert und wieder getrocknet. 1 - 2 Tropfen Giemsa-Lösung (Merck) wurden pro 1 ml Wasser zugegeben (diese Reihenfolge!). Mit dieser Färbelösung wurden die Zellen 20 - 30 Minuten lang überschichtet, dann mit Leitungswasser gründlich gespült und trocken gelassen. Die Betrachtung erfolgte unter dem Mikroskop bei 1200-facher Vergrößerung mit Ölimmersion. Pro Petrischale wurden viermal ca. 50 Zellen ausgezählt. Bei normalen C3Hf- bzw. C57Bl/6-Peritonealzellen konnten $97 \pm 2\%$ bzw. $96 \pm 2\%$ und bei Peritonealzellen aus infizierten Tieren $94 \pm 4\%$ bzw. $97 \pm 2\%$ der insgesamt haftenden Zellen als Makrophagen identifiziert werden (je 3 Petrischalen wurden ausgezählt).

7.1.2.2. Ablösen haftender normaler Makrophagen

Den gewaschenen Zellrasen wurde 1 ml einer Lösung von 0,1% Trypsin (Serva) und 0,01% EDTA in PBS (ohne Mg^{++} und Ca^{++}) zugesetzt (171) und so lange bei 37°C inkubiert (10 - 20 Minuten), bis alle Zellen abgekugelt waren (mikroskopische Kontrolle). Die Zellen wurden dann vorsichtig mit einem Gummispatel abgelöst und sofort in der Zählkammer gezählt.

7.1.2.3. Proteinbestimmung der haftenden Zellen

2×10^6 Peritonealzellen wurden in Petrischalen eingesät und, wie unter V.7.1.1.1. und 7.1.2. beschrieben, behandelt. Nach dem Abwaschen des Zellrasens wurden 0,25 ml dest. Wasser zugegeben, die Zellen mit dem Gummispatel abgelöst und im Ultraschallbad (Poly-Son Ultraschall System 150, Lux) 1 Minute beschallt. Die Proteinbestimmung der Lysate erfolgte nach Lowry et al. (172).

7.1.3. Bindung und Abtötung der Bakterien durch Makrophagen

Nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden (siehe V.7.1.1.) wurde das antibiotikahaltige Medium abdekantiert, die Zellen einmal mit 2 ml warmem PBS gewaschen und in antibiotikafreiem Eagle's + Hepes-Medium im nicht begasten Brutschrank für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde dieses Medium entfernt und $1 - 4 \times 10^5$ opsonisierte oder $5 - 10 \times 10^5$ nicht opsonisierte Bakterien in je 1 ml vorgewärmtem Eagle's + Hepes Medium pro Schale zugegeben (= Zeitpunkt -5). Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurde das Medium dekantiert und kaltes PBS (10°C) zugesetzt, um Phagozytose und Bakterientötung zu stoppen. Durch Spülen des Zellrasens mit 2×10 ml kaltem PBS wurden freie Bakterien entfernt. In 3 Schalen wurden zu diesem als Zeitpunkt 0 bezeichneten Zeitpunkt des Versuchs die Makrophagen lysiert, indem 1 ml eiskaltes PBS pro Petrischale zugesetzt und die Zellen mit einem Gummispatel abgelöst wurden. Die weiteren Schalen wurden wieder mit warmem Eagle's + Hepes-Medium versetzt, bei 37°C inkubiert und zu den entsprechenden Zeiten ebenfalls in 1 ml kaltem PBS lysiert. Pro angegebenem Zeitpunkt wurden jeweils 3 Schalen lysiert und pro Schale jeweils 2 Aliquots von 0,1 ml auf Loeb-Agar zur Lebendzellzahlbestimmung plattiert. Die Zahl der lebenden Bakterien zum Zeitpunkt 0 wurde als die Zahl der an Makrophagen assoziierten Bakterien betrachtet und bezüglich der nachfolgenden Bakterientötung oder -vermehrung gleich 100% gesetzt.

Als Kontrolle, daß eine Abtötung der Bakterien nicht durch einen Zellverlust beim Dekantieren des Inkubationsmediums vor der Lyse der Makrophagen vorgetäuscht wird, wurde nach 30 Minuten Inkubation mit

avirulenten Bakterien direkt im Medium lysiert. Die erzielte Abtötung der Bakterien war nur um 10% niedriger gegenüber Ansätzen, in denen das Medium dekantiert und in PBS lysiert worden war, und bewegte sich damit innerhalb der Fehlergrenze.

7.1.3.1. Behandlung der Makrophagen mit Cytochalasin B

Der in V.7.1.3. beschriebene Versuch wurde in folgender Abwandlung auch in Gegenwart von Cytochalasin B durchgeführt. Cytochalasin B (Sigma), das in DMSO gelöst war, wurde jeweils in einer Endverdünnung von 1 µg/ml Medium eingesetzt. Zusatz zum Kulturmedium vor Bakterienzugabe erfolgte 10 Minuten vor dieser. Die zugegebenen Bakterien wurden auch in Cytochalasin B-haltigem Medium suspendiert. Die Inkubation nach dem Abwaschen freier Bakterien erfolgte ebenfalls in Medium mit Cytochalasin B. Dem zum Waschen verwendeten PBS war kein Cytochalasin B zugesetzt. Die Verdünnung von Cytochalasin B in Eagle's + HEPES-Medium erfolgte immer erst vor Versuchsbeginn. Danach wurde das Medium sterilfiltriert. Die Stammlösung von Cytochalasin B in DMSO wurde bei -20°C aufbewahrt.

7.1.3.2. Behandlung der Makrophagen mit 2-Desoxy-D-glukose

Der Einsatz von 2-Desoxyglukose (Serva) in dem in V.7.1.3. beschriebenen Versuch geschah folgendermaßen. Sämtliche Lösungen, mit denen die Makrophagen ab 1 Stunde vor Zugabe der Bakterien bis zu ihrer Lyse in Kontakt kamen, wurde dieses Agens zugesetzt: Eagle's + HEPES-Medium 50 mM (90) und PBS 20 mM.

7.2. Test auf bakterizide Aktivität in Überständen von ruhenden und phagozytierenden Makrophagen

Der Versuch, wie in V.7.1.3. beschrieben, wurde durchgeführt. Die Kulturüberstände der Makrophageninkubation (Eagle's + HEPES-Medium) wurden jedoch gesammelt. Einmal vor Zugabe der Bakterien und zu verschied-

denen Zeiten (7,5; 15 und 30 Minuten) nach Bakterienzugabe vor der Lyse der Makrophagen. Die Überstände von je 3 Schalen wurden vereinigt, 10 Minuten bei 500 x g zellfrei zentrifugiert, mit 10^3 avirulenten S.typhimurium SF 10223 beimpft und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle diente reines Eagle's + Hepes-Medium. Nach Zugabe der Bakterien wurde geschüttelt und sofort 0,1 ml Aliquots auf Loeb-Agar plattiert, ebenso nach 30 Minuten Inkubation. Da in den 4 Kontrollröhrchen nach 30 Minuten die suspendierte Zahl lebender Bakterien einheitlich um 20% abgenommen hatte, wurden die Bakterienzahlen in den Teströhrchen nach 30 Minuten auf die Kontrollwerte bei 30 Minuten als 100% bezogen.

7.3. Bindung und Abtötung von radioaktiv markierten Bakterien durch Peritonealmakrophagen

$1,5 \times 10^6$ Peritonealzellen aus normalen Mäusen wurden in 2 ml Eagle's-Medium mit Antibiotika in Petrischalen ($\varnothing$ 35 mm) eingesät. Die weitere Behandlung der Makrophagen erfolgte, wie in V.7.1.1.1. beschrieben. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen einmal mit 2 ml warmem PBS gewaschen und 1 Stunde in antibiotikafreiem Eagle's + Hepes-Medium inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und $1 - 2 \times 10^6$ opsonisierte oder 8×10^6 nicht opsonisierte lebende bzw. 1×10^7 opsonisierte oder 3×10^7 nicht opsonisierte UV-getötete mit ^3H -Thymidin markierte S.typhimurium (siehe V.2.4.) in 1 ml Eagle's + Hepes-Medium pro Schale zugegeben. Die Opsonisierung toter Bakterien erfolgte nach der UV-Bestrahlung. Der weitere Versuchsgang bis zur Lyse der Makrophagen ist mit dem in V.7.1.3. beschriebenen identisch.

Jeweils 0,1 ml des Makrophagenlysats wurde zur Lebendzellzahlbestimmung (Kolonienbildung) verwendet, die restlichen 0,9 ml zur Radioaktivitätsmessung. Dazu wurden pro Gläschen 20 ml Szintillationsflüssigkeit (Roth) folgender Zusammensetzung zugegeben:

3	l	Xylol
1	l	Triton x 114
0,2	l	Wasser
12	g	2,5-Diphenyloxazid (PPO)

und die Proben nach 1 Tag im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer

(Packard Tri-Carb Modell 3390) gemessen. Von der Bakteriensuspension, die zu den Makrophagen gegeben wurde, wurde ebenfalls 1 ml gemessen. Die Veränderung des Verhältnisses von Radioaktivität/lebende Bakterien vor Zugabe zu Makrophagen und nach Inkubation mit Makrophagen gibt die Abtötung der Bakterien durch Makrophagen wieder.

7.4. Chemilumineszenz

7.4.1. Kulturbedingungen der Makrophagen

3×10^6 Peritonealzellen aus normalen oder infizierten Mäusen, bzw. 1×10^6 Peritonealzellen aus mit Thioglykollat-Medium stimulierten Mäusen wurden in 5 ml Eagle's-Medium (mit Antibiotika) in sterile Packard-Gläschen eingesät. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden im CO_2 -begasten Brutschrank (12% CO_2) bei 37°C wurde das Medium abdekantiert, nicht adhärierende Zellen durch Waschen mit zweimal 5 ml warmem PBS entfernt und die Zellrasen mit je 5 ml Eagle's-Medium (mit Antibiotika) 24 Stunden weiterinkubiert.

7.4.2. Herstellung einer Luminol-gesättigten Lösung in FCS

100 mg Luminol (3-Aminophthalhydrazid; Sigma) wurden mit einer Pasteurpipette zerstoßen, 1 Stunde mit 10 ml inaktiviertem FCS bei 37°C inkubiert (mehrmals schütteln) und nicht gelöstes Luminol in der Tisch-zentrifuge abzentrifugiert (30 Minuten, 2 000 UpM). Die mit Luminol gesättigte Lösung wurde in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren und nur einmal aufgetaut.

7.4.3. Messung der Chemilumineszenz-Respons auf Bakterien

Nach einer Kultivierungszeit der Makrophagen von 24 Stunden wurde das antibiotikahaltige Eagle's-Medium abdekantiert, die Zellrasen zweimal mit 5 ml warmem PBS gewaschen, 2,5 ml antibiotikafreies - soweit nicht

anders angegeben - Eagle's + Hepes-Medium (ohne Phenolrot !) und 25 µl Luminol in FCS zugegeben. Die Kulturen wurden 1 Stunde vor der Messung im dunklen Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät (Packard, Modell 3002), das auf 37°C temperiert war, inkubiert.

Während der Messung war der Raum abgedunkelt und nur mit einer vom Meßgerät abgewandten 60 Watt Glühbirne schwach erhellt. Am Szintillations-Spektrometer war die Koinzidenzschtaltung abgestellt und das ^3H -Energiefenster ganz offen. Der Meßblock war auch im Innern auf 37°C erwärmt.

Die einzelnen Proben wurden in der Regel in Abständen von 0,5 - 2 Minuten jeweils 12 Sekunden gemessen. Die Ansätze wurden immer doppelt oder dreifach gemacht und alternierend gemessen, wozu die Gläschen nur zur Messung in den Meßblock gefahren wurden.

10 Minuten vor Bakterienzugabe begann jeweils die Messung zur Ermittlung der Grundaktivität und der Prüfung ihrer Konstanz. Soweit nicht anders angegeben, ist die Basalaktivität bei den dargestellten Meßwerten abgezogen. In der Regel wurden $1 - 3 \times 10^6$ Bakterien in 25 µl Eagle's + Hepes-Medium zugegeben (= Zeitpunkt 0).

7.4.3.1. Behandlung der Makrophagen mit Cytochalasin B

Cytochalasin B (Sigma), in DMSO gelöst, wurde in einer Endkonzentration von 1 µg/ml Medium zugegeben, wobei ein Zusatz von DMSO in einer Endkonzentration von 0,01% erfolgte. Wurde Cytochalasin B vor der Zugabe der Bakterien eingesetzt, so wurde es 10 Minuten vor den Bakterien zugegeben. Ansonsten erfolgte die Zugabe zu den angegebenen Zeiten.

7.4.3.2. Behandlung der Makrophagen mit 2-Desoxy-D-glukose

Ab 1 Stunde vor Zugabe der Bakterien wurden die Makrophagen in Eagle's + Hepes-Medium mit 50 mM 2-Desoxyglukose inkubiert.

7.4.3.3. Behandlung der Makrophagen mit Ultraschall und NADH oder NADPH

Makrophagen wurden direkt vor Zugabe der Bakterien in den Packard-Gläschen 1 Minute im Ultraschallbad (Poly-Son Ultraschall System 150, Lux) beschallt. Zum Versuch der Restauration der Chemilumineszenz-Reaktion der lysierten Makrophagen wurde NADH oder NADPH jeweils 0,1 mM zu einem Teil der Ansätze noch vor Zugabe der Bakterien zugesetzt.

7.4.3.4. Messung der Chemilumineszenz-Respons nach Entfernung freier Bakterien

Der in V.7.4.3. beschriebene Versuchsablauf wurde wie folgt verändert. Nach Erreichen des Chemilumineszenz-Maximums (5 - 7 Minuten nach Bakterienzugabe) wurde das Medium abdekantiert, die Zellrasen zweimal mit je 5 ml warmem Eagle's + Hepes-Medium, das auch Luminol enthielt, gewaschen und in bakterienfreiem Eagle's + Hepes-Medium mit Luminol weiterinkubiert und gemessen.

8. Einwirkung eines Xanthinoxidase-Systems und von Lysozym auf S.typhimurium

8.1. Reaktionsansatz des Xanthinoxidase-Systems

Die zellfreie Erzeugung von Superoxid-Anion durch die aerobe Oxidation von Xanthin durch Xanthinoxidase erfolgte nach McCord und Fridovich (124). Der Reaktionsansatz von 1 ml enthielt:

Kalium-Phosphatpuffer	50	mM, pH 7,8
EDTA	0,1	mM
Xanthin (Sigma)	0,05	mM
Xanthinoxidase	10	µl

Xanthinoxidase (aus Buttermilch, suspendiert in 2,4 M NH_4SO_4 , dem noch 0,02% Natrium-Salicylat zugesetzt war; Sigma) 20 µl dieser Suspension

wurden in 10 mM Phosphat-Puffer verdünnt. 10 µl dieser Enzymverdünnung wurden jeweils pro Reaktionsansatz eingesetzt.

Gemessen über die Reduktion von Cytochrom C (aus Pferdeherz, Sigma) nach (124) erzeugte dieser Ansatz bei 37°C innerhalb 5 Minuten 21 nM Superoxid-Anion.

8.2. Testbedingungen

Zum Test auf die Einwirkung des Xanthinoxidase-Systems auf Bakterien wurde dem in V.8.1. beschriebenen Ansatz, der aber noch kein Xanthin enthielt, $1 - 2 \times 10^6$ Bakterien in 100 µl 0,9%-iger NaCl-Lösung zugegeben, 1 Minute bei 37°C vorinkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von Xanthin gestartet (Endvolumen 1,1 ml). Nach 5 Minuten bei 37°C wurde im Eisbad die Reaktion gestoppt und nach 30 Minuten eine geeignete Verdünnung in PBS auf Loeb-Agar plattiert. Zur Kontrolle wurden Bakterien im Ansatz ohne Xanthin inkubiert. Die Lebendzellzahl dieser Kontrollen wurde gleich 100% gesetzt.

Diese Testbedingungen wurden noch folgendermaßen variiert:

- a.) Während der 30-minütigen Inkubation bei 0°C wurde Lysozym (Serva) (100 µg/ml) zugesetzt.
- b.) Die 30-minütige Inkubation nach Lysozymzugabe erfolgte ebenfalls bei 37°C.
- c.) Die Inkubation bei 0°C wurde nach Verdünnung in PBS ohne Lysozymbehandlung auf 24 Stunden ausgedehnt.

9. Biochemische Untersuchungen an S.typhimurium

S.typhimurium SF10223 und SF1826 wurden unter jeweils gleichen Bedingungen gezüchtet und aufgearbeitet.

9.1. Bestimmung der Superoxid-Dismutase-Aktivität

9.1.1. Zellaufschluß mit der French-Press

500 ml Standard I-Nährbouillon wurden mit 20 ml einer Übernachtskultur beimpft und 3 Stunden als Standkultur bei 37°C bebrütet. Die Zellen wurden

in 5 Minuten bei einer maximalen Beschleunigung von $8000 \times g$ abzentrifugiert. Der Zellaufschluß erfolgte nach Schnaitman (173) und Smit et al. (174). Die sedimentierten Zellen wurden dazu in 15 ml 10 mM Hepes-Puffer, pH 7,4, resuspendiert, jeweils 0,5 mg DNase und RNase zugesetzt und zweimal mit der French-Press mit 1200 kg/cm^2 behandelt.

9.1.2. Fraktionierung des Zellhomogenats

Zur Trennung von löslicher und partikulärer Fraktion des mit der French-Press erhaltenen Zellhomogenats (11 ml) wurde 2 Stunden in einem Beckman 60 Ti Rotor bei 40 000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierte partikuläre Fraktion wurde in 1 ml 10 mM Hepes-Puffer aufgenommen.

9.1.3. Zellaufschluß durch EDTA- und Lysozymbehandlung

50 ml Standard I-Nährbouillon wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur beimpft und 3 Stunden als Standkultur bei 37°C wachsen gelassen. Die Zellen wurden in 15 Minuten bei einer maximalen g-Zahl von 12 000 abzentrifugiert, einmal mit 35 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte nach Kanegasaki und Wright (175). Dazu wurde das gewaschene Zellsediment in 2,5 ml 0,015 M Tris/HCl-Puffer mit 0,01 M EDTA aufgenommen und bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde 1 mg Lysozym (Serva) zugesetzt und 4 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 mg DNase, 0,5 ml 0,5 M Tris/HCl und 0,25 ml 0,2 M MgCl_2 wurde nochmals 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Das so erhaltene Homogenat wurde in der Kälte gegen 400 ml 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,8 dialysiert.

9.1.4. Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität der Superoxid-Dismutase wurde über die Hemmung bestimmt, die sie auf die Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium (NBT) durch

Xanthin/Xanthinoxidase ausübte (130). Der Testansatz von 1 ml enthielt:

0,05 M Natrium-Carbonat-Puffer, pH 10,2
0,1 mM EDTA
0,025 mM NBT (Sigma, als NBT-Chlorid)
0,1 mM Xanthin (Sigma)
10 µl Xanthinoxidase (s. V.8.1.)

Verschiedene Mengen der zu testenden Homogenate oder Fraktionen wurden zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Xanthin gestartet. Die Inkubation erfolgte 3 Minuten bei 37°C. Es wurde die Menge an Protein-Homogenat (Proteinbestimmung nach Lowry et al. (172)) bestimmt, die nötig war um die Reduktion von NBT um 50% zu hemmen, gemessen als Abnahme der $A_{560\text{nm}}$ /Minute, und als eine Enzymeinheit (U) definiert.

9.2. Bestimmung des Proteinmusters der äußeren Membran

9.2.1. Isolierung der äußeren Membranfraktion

9.2.1.1. Züchtungsbedingungen

200 ml A 3-Medium wurden mit 10 ml einer Übernachtskultur beimpft und als Standkultur bis zu $OD_{600\text{nm}}$: 1 - 1,2 (3 - 4 Stunden) inkubiert.

9.2.1.2. Sphäroplastierung

Die Bakterien wurden in 5 Minuten bei 8000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Die Isolierung der äußeren Membranfraktion geschah modifiziert nach Mizushima und Yamada (176). Alle Schritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt. Die sedimentierten Bakterien wurden einmal mit 16 ml destilliertem Wasser gewaschen. Das Sediment in 7,1 ml dest. Wasser aufgenommen, in einen 200 ml Erlenmeyerkolben gegeben und die nachfolgend aufgeführten vorgekühlten Reagenzien langsam unter Schütteln in der angegebenen

Reihenfolge zugegeben:

4	ml	0,1 M	Tris/HCl-Puffer (pH 8,3)
3,6	ml	2,0 M	Saccharose
0,7	ml	1,0 %	EDTA (Natrium-Salz, pH 7,0)
0,7	ml	0,5 %	Lysozym (Serva)

3 Minuten Inkubation unter Schütteln im 40°C heißem Wasserbad und ca. 7 Minuten bei 30°C schlossen sich an. Unter dem Mikroskop muß dabei die Sphäroplastierung verfolgt werden. Es wurde 10 Minuten bei 12 000 x g zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde abgossen und 45 Minuten im 50 Ti Rotor bei 38 000 UpM zentrifugiert (Beckman). Das Sediment wurde in 2 ml 1%-iger EDTA-Lösung resuspendiert und 24 Stunden gegen 300 ml 1%-igem EDTA bei 4°C dialysiert. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei einer maximalen g-Zahl von 27 000 wird das Sediment in 0,9 ml 10 mM Hepes-Puffer aufgenommen und auf einen Saccharosegradienten aufgetragen.

9.2.1.3. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

Der Gradient wurde wie folgt hergestellt. Saccharose wurde in 10 mM Hepes-Puffer, pH 7,4 gelöst und in den angegebenen Volumina und Konzentrationen verwendet:

1,5	ml	2,02 M
6,0	ml	1,44 M
4,0	ml	0,77 M

1 ml in Hepes-Puffer suspendiertes Sediment (siehe V.9.2.1.2.) wurde auf den Gradienten aufgetragen und 15 Stunden in SW 40 Rotor (Beckman) bei 25 000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Gradient wurde beim Austropfen fraktioniert (8 Tropfen pro Fraktion) und die Absorption bei 280 nm bestimmt.

Die Fraktionen des Proteinpeaks wurden vereinigt, 1 Stunde im 50 Ti Rotor (Beckman) bei 45 000 UpM und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 0,25 ml 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 aufgenommen.

9.2.2. Trennung der Membranproteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

9.2.2.1. Herstellung der Gele

Stammlösung I:

300 g Acrylsäureamid (Serva)

8 g N, N'-Methylen-Bis-Acrylsäureamid (Serva)

Mit Wasser auf 1 l auffüllen, filtrieren und gekühlt im Dunkeln aufbewahren.

a.) Zusammensetzung von Gel I (13% Acrylamid):

1,5 M	Tris/HCl-Puffer, pH 8,8	3,75 ml
10%-ige	SDS-Lösung (in Wasser)	0,15 ml
Stammlösung I		6,50 ml
10%-ige	Ammoniumperoxodisulfat	
	(Serva)-Lösung	0,075 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthylendia-		
min) (Serva)		0,005 ml

b.) Zusammensetzung von Gel II (5% Acrylamid):

0,5 M	Tris/HCl-Puffer, pH 6,8	1,5 ml
10%-ige	SDS-Lösung	0,06 ml
Stammlösung I		1,0 ml
10%-ige	Ammoniumperoxodisulfat	0,06 ml
Wasser		3,38 ml
TEMED		0,003 ml

c.) Polymerisation der Gele:

Die Gele wurden evakuiert. Das Polymerisationsgemisch von Gel I wurde zuerst zwischen 2 Glasplatten von 1 mm Abstand (13 x 14,5 cm) gefüllt, gegen Austrocknen mit etwas Wasser überschichtet und zur Polymerisation über Nacht bei Raumtemperatur gehalten. Danach wurde das Polymerisationsgemisch von Gel II daraufgegeben: Polymerisationszeit 2 Stunden. Während dieser Zeit wurden durch einen kammartigen Aufsatz im Gel II 10 Vertiefungen zum Auftragen der Proben ausgespart.

9.2.2.2. Desintegration der Membranpräparation

Zusammensetzung der Desintegrationslösung:

1 M Tris/HCl, pH 6,8	6,25	ml
20%-ige SDS-Lösung	10,00	ml
Mercaptoäthanol	5,00	ml
Glycerin	10,00	ml
Wasser	0,42	ml
Bromphenolblau	0,002	ml

Zu 2 Teilen Membranpräparation wurde 1 Teil Desintegrationslösung gegeben und 5 Minuten in kochendem Wasserbad inkubiert.

9.2.2.3. Bedingungen für die Elektrophorese

Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers:

3 g	Tris
14,4 g	Glycin
10 ml	10%-iges SDS
Aqua. dest. ad 1000 ml	

Im oberen und unteren Reservoir wurde dieser Puffer eingefüllt. 6 - 40 μ l (15-80 μ g Protein) der Membran-Desintegrationsmischung wurden durch Unterschichten des Elektrophoresepuffers in die Vertiefungen im Gel II aufgetragen.

Als Standardproteine für Molekulargewichte dienen:

	Dalton
Catalase (aus Rinderleber) (Sigma)	60 000
Ovalbumin (Sigma)	45 000
Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (Sigma)	37 000
Carbonsäureanhydrase (Sigma)	29 000
Sojabohnen- Trypsininhibitor (Sigma)	21 000
Myoglobin (aus Waal-Spermien) (Sigma)	17 800
Lysozym (Sigma)	14 000
Cytochrom C (aus Pferdeherz) (Sigma)	12 800

Aus Stammlösungen von je 1 mg Standardprotein/ml wurden je 10 µl vereinigt und mit dem gleichen Volumen (80 µl) Desintegrationslösung behandelt. 10 µl dieser Mischung wurden auf das Gel gegeben.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst 0,5 Stunden bei 18 mA und dann 3,5 Stunden bei 25 mA. In dieser Zeit war die Gelfront (Bromphenolblau) bis 0,5 cm vor das Gelende gewandert.

9.2.3. Färbung der Gele

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit destilliertem Wasser gespült und die Proteine gefärbt.

Zusammensetzung der Coomassie-Farblösungen:

	I	II	III
Isopropylalkohol	500 ml	200 ml	-
Eisessig	200 ml	200 ml	200 ml
Wasser	1300 ml	1600 ml	1800 ml
Coomassie Brilliant			
Blue G 250 (Serva)	800 ml	60 ml	20 ml

Proteinanfärbung im Gel:

- Über Nacht in Coomassie I zum Fixieren und Färben.
- Je 4 Stunden Inkubation in Coomassie II und III
- und über Nacht in 1 : 10 verdünnten Eisessig dienen dem Eluieren von nicht an Protein gebundenem Farbstoff.

Die blau gefärbten Gele wurden photographiert.

VI. Literaturverzeichnis

1. Opferkuch, W. und Schmidt, U., in: Vorlaender, K.O. (Hrsg.)
Praxis der Immunologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1976)
2. Gewurz, G., Shin, H.S. und Mergenhagen, S.E.,
J. Exp. Med. 128, 1049 (1968)
3. Fine, D.P., Marney, Jr., S.R., Colley, D.G., Sergent, J.S. und Des Prez,
R.M.
J. Immunol. 109, 807 (1972)
4. Gowans, J.L. und McGregor, D.D.,
Progr. Allergy 9, 1 (1965)
5. Blanden, R.V. und Langman, R.E.,
Scand. J. Immunol. 1, 379 (1972)
6. Lane, F.C. und Unanue, E.R.,
J. Exp. Med. 135, 1104 (1972)
7. North, R.J.,
Cell. Immunol. 7, 166 (1973)
8. Roitt, I.,
Leitfaden der Immunologie, Steinkopff Verlag, Darmstadt (1977)
9. Kauffmann, F., The bacteriology of Enterobacteriaceae, Munksgaard,
Copenhagen (1966)
10. Salmonella-Subkommittee, The genus Salmonella, J.Hyg. 34, 333 (1934)
11. Kauffmann, F., Serological diagnosis of Salmonella-Spezies, Munksgaard,
Copenhagen (1972)
12. Davies, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. und Wood, Jr.,
W.B., in: Microbiology, Second Edition, S. 772-776, Harper & Row, New
York (1973)
13. Finger, H., Immunität und Infektion 2, 1, 63 (1974)
14. Chuttani, C.S., Prakash, K., Gupta, P., Grover, V. und Kumar, A.,
Bull. Wld. Hlth. Org. 55, 643 (1977)
15. Germanier, R.,
Infect. Immun. 5, 792 (1972)
16. Collins, F.M.,
Bacteriol. Rev. 38, 371 (1974)
17. Ørskov, J., Jensen, K.A. und Kobayashi, K.,
Z. Immunitätsforsch. 55, 34 (1928)

18. Hobson, D.,
J. Hyg. 55, 334 (1957)
19. Mackaness, G.B., Blanden, R.V. und Collins, F.M.,
J. Exp. Med. 124, 573 (1966)
20. Hornick, R.B., Greisman, S.E., Woodward, T.E., Dupont, H.L., Dawkins,
A.T. und Snyder, M.J.,
New Engl. J. Med. 283, 686 (1970)
21. Ottow, J.C.G.,
Ann. Rev. Microbiol. 29, 79 (1975)
22. Arkwright, J.A.,
Pathol. Bacteriol. 30, 345 (1927)
23. Lüderitz, O., Westphal, O., Staub, A.M. und Nikaido, H.,
in: Weinbaum, G., Kadis, und Ajl, S.J. (Hrsg.), Microbial Toxins,
Vol. IV, S. 145-233, Academic Press, New York (1971)
24. Galanos, C., Lüderitz, O., Rietschel, E.T. und Westphal, O.,
in: Goodwin, T.W. (Hrsg.), International Review of Biochemistry, Bio-
chemistry of Lipids II, Vol. 14, 239-335, University Park Press, Baltimore
(1977)
25. Lüderitz, O., Staub, A.M. und Westphal, O.,
Bacteriol. Rev. 30, 192 (1966)
26. Schmidt, G., Fromme, I. und Mayer, H.,
Eur. J. Biochem. 14, 357 (1970)
27. Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V., Nurminen, M., Rietschel, E.T.,
Rosenfelder, G., Simon, M. und Westphal, O.,
J. Infect. Dis. 128, 17 (1973)
28. Roantree, R.J.,
Ann. Rev. Microbiol. 21, 433 (1967)
29. Dlabac V.,
Folia Microbiologica, 13, 439 (1968)
30. Fauve, M.R.,
Ann. Inst. Pasteur 107, 472 (1964)
31. Rowley, D.J.,
J. Infect. Dis. 128 (Suppl.), 162 (1973)
32. Rowley, D.J.,
J. Infect. Dis. 123, 317 (1971)
33. Mäkelä, P.H., Valtonen, V.V. und Valtonen, M.,
J. Infect. Dis. 128 (Suppl.), 73 (1973)

34. Kiefer, W., Schmidt, G., Jann, B. und Jann, K.,
J. Gen. Microbiol. 92, 311 (1976)
35. Kiefer, W., Gransow, P., Schmidt, G. und Westphal, O.,
Infect. Immun. 13, 1517 (1976)
36. Webster, L.T.,
J. Exp. Med. 65, 261 (1937)
37. Gowen, J.W.,
Bacteriol. Rev. 24, 192 (1960)
38. Furness, G.,
J. Infect. Dis. 103, 272 (1958)
39. Gelzer, J. und Suter, E.,
J. Exp. Med. 110, 715 (1959)
40. Jenkin, C. und Benacerraf, B.,
J. Exp. Med., 112, 403 (1960)
41. Gröschel, D., Paas, C.M.S. und Rosenberg, B.S.,
J. Reticuloendothel. Soc. 7, 484 (1970)
42. Maier, T. und Oels, H.C.,
Infect. Immun. 6, 438 (1972)
43. Rowley, D. und Whitby, J.C.,
Brit. J. Exp. Path., 40, 507 (1959)
44. Jenkin, C.R. und Rowley, D.,
Bacteriol. Rev. 27, 391 (1963)
45. Kenny, K. und Herzberg, M.,
J. Bacteriol. 93, 773 (1967)
46. Blanden, R.V., Mackaness, G.B. und Collins, F.M.,
J. Exp. Med. 124, 585 (1966)
47. Rosenberg, L.T. und Tachibana, D.K.,
J. Immunol. 89, 861 (1962)
48. Steward, J.P. und Roantree, R.J.,
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 108, 654 (1961)
49. Mackaness, G.B., in: Mudd, S. (Hrsg.), Infectious Agents and Host Reactions, S. 61-75, W.B. Saunders Co. (1970)
50. Collins, F.M. und Mackaness, G.B.,
J. Immunol. 101, 830 (1968)
51. Collins, F.M.,
J. Reticuloendothel. Soc. 10, 58, (1971)

52. Hochadel, J.F. und Keller, K.F.,
J. Infect. Dis. 135, 813 (1977)
53. Zinkernagel, R.M.,
Infect. Immun. 13, 1069 (1976)
54. v.Jeney, N.L.,
Dissertation Freiburg (1976)
55. Chang, Y.T.,
J. Nat. Cancer Inst. 32, 19 (1964)
56. Cohn, Z.A. und Benson, B.,
J. Exp. Med. 121, 153 (1965)
57. Rowley, D.,
Nature 181, 1738 (1958)
58. Whitby, J.L. und Rowley, D.,
Brit. J. Exp. Path. 40, 358 (1959)
59. Hobson, D.,
J. Hyg. 55, 322 (1957)
60. Pike, R.M. und Mackenzie, G.M.,
J. Bacteriol. 40, 171 (1940)
61. Collins, F.M., Mackaness, G.B. und Blanden, R.V.,
J. Exp. Med. 124, 601 (1966)
62. Gransow, P.,
Dissertation Freiburg (1977)
63. Bianco, C., Griffin, F.M. und Silverstein, S.C.,
J. Exp. Med. 141, 1278 (1975)
64. Stadler, B.M., Bern, persönliche Mitteilung (1978)
65. Holmes, B., Quie, P., Windhorst, D.B., Pollarca, B. und Good, R.A.,
Nature (London) 210, 1131 (1966)
66. Patterson, R.J. und Youmans, G.P.,
Infect. Immun., 1, 30 (1970)
67. Menzel, J., Jungfer, H. und Gernsa, A.,
Infect. Immun. 19, 659 (1978)
68. Olson, P.R., Weiblen, B.J., O'Leary, J.J., Moscovitz, A.J. und
McCullough, J. Vox Sang. 30, 149 (1976)
69. Scott, D.W. und Gershon, R.K.,
Clin. Exp. Immunol. 6, 313 (1970)

70. Böhme, D.H., Schneider, H.A. und Lee, J.M.,
J. Exp. Med. 110, 9 (1959)
71. Benacerraf, B., Sebesteyen, M.M. und Schlossmann, S.,
J. Exp. Med. 110, 27 (1959)
72. Rogers, D.E. und Melly, M.A.,
J. Exp. Med. 105, 113 (1957)
73. Jenkin, C.R.,
Brit. J. Exp. Path. 44, 47 (1962)
74. Jenkin, C.R.,
J. Exp. Med. 115, 731 (1962)
75. Hobson, D.,
J. Pathol. Bacteriol. 73, 399 (1957)
76. Meerpohl, H.-G., Lohmann-Matthes, M.-L. und Fischer, H.,
Eur. J. Immunol. 6, 213 (1976)
77. Lohmann-Matthes, M.-L. und Fischer, H.,
Transplant. Rev. 17, 150 (1973)
78. Lohmann-Matthes, M.-L., Schipper, H. und Fischer, H.,
Eur. J. Immunol. 2, 45 (1972)
79. North, R.J. und Kirstein, D.P.,
J. Exp. Med. 145, 275 (1977)
80. Gordon, S., Todd, J. und Cohn, Z.A.,
J. Exp. Med. 139, 1288 (1974)
81. Schnyder, J. und Baggiolini, M.,
J. Exp. Med. 148, 435 (1978)
82. Biggar, W.D. und Sturgess, J.M.,
Infect. Immun. 16, 974 (1977)
83. Davies, P., Page, R.C. und Allison, A.C.,
J. Exp. Med. 139, 1262 (1974)
84. Bast, R.C., Cleveland, R.P., Littmann, B.H., Zbar, B. und Rapp, H.J.,
Cell. Immunol. 10, 248 (1974)
85. Middlebrook, G., Salmon, B.J. und Kreisberg, J.I.,
Cell. Immunol. 14, 270 (1974)
86. Simon, H.B. und Sheagren, J.N.,
Cell. Immunol. 4, 163 (1972)

87. Allison, A.C., Davies, P. und DePetris, S.,
Nature 232, 153 (1971)
88. Hartwig, J.H. und Stossel, T.P.
J. Cell Biol. 71, 295 (1976)
89. Michl, J., Ohlbaum, D.J. und Silverstein, S.C.,
J. Exp. Med. 144, 1484 (1976)
90. Michl, J., Ohlbaum, D.J. und Silverstein, S.C.,
J. Exp. Med. 144, 1465 (1976)
91. Wills, E.J., Davies, P., Allison, A.C. und Haswell, A.D.,
Nature 240, 58 (1972)
92. Rabinovitch, M., in: van Furth, R. (Hrsg.), Mononuclear Phagocytes, S. 299
Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford (1970)
93. Mantovani, B., Rabinovitch, M. und Nussenzweig, V.,
J. Exp. Med. 135, 780 (1972)
94. Griffin, F.M., Bianco, C. und Silverstein, S.C.,
J. Exp. Med. 141, 1269 (1975)
95. Ehlenberger, A.G. und Nussenzweig, V.,
J. Exp. Med. 145, 357 (1977)
96. Baldrige, C.W. und Gerard, R.W.,
Am. J. Physiol. 103, 235 (1933)
97. Karnovsky, M.L.,
Semin. Hematol. 5, 156 (1968)
98. Goldstein, I.M., Cerqueira, M., Lind, S. und Kaplan, H.B.,
J. Clin. Invest. 59, 249 (1977)
99. Rossi, F. und Zatti, M.,
Experientia 20, 21 (1964)
100. Curnutte, J.T., Kipnes, R.S. und Babior, B.M.,
New Engl. J. Med. 293, 628 (1975)
101. Paul, B.B., Strauss, R.R., Jacobs, A.A. und Sbarra, A.J.,
Exp. Cell Res. 73, 456 (1972)
102. Babior, B.M., Kipnes, R.S. und Curnutte, J.T.,
J. Clin. Invest. 52, 741 (1973)
103. Inverson, D., DeChatelet, L.R., Spitznagel, J.K. und Wang, P.,
J. Clin. Invest. 59, 282 (1977)
104. Arneson, R.M.,
Arch. Biochem. Biophys. 136, 352 (1970)

105. Allen, R.C., Yevich, S.J., Orth, R.W. und Steele, R.H.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 909 (1974)
106. Haber, F. und Weiss, J.,
Proc. R. Soc. Lond. Ser. A 147, 332 (1934)
107. Fong, K.-L., McCay, P.B., Poyer, J.C., Keele, B.B. und Misra, H.,
J. Biol. Chem. 248, 7792 (1973)
108. Krinsky, N.I.,
TIBS-February, 35 (1977)
109. Root, R.K., Metcalf, J., Oshino, N. und Chance, B.,
J. Clin. Invest. 55, 945 (1975)
110. Klebanoff, S.J., in: Bellanti, J.A. und Dayton, D.H. (Hrsg.), The Phago-
cytic Cell in Host Resistance. Raven Press, New York (1975)
111. Johnston, R.B., Keele, B.B., Misra, H.P., Lehmyer, J.E., Webb, L.S.,
Baehner, R.L. und Rajagopalan, K.V.,
J. Clin. Invest. 55, 1357 (1975)
112. Weismann, G., Zurier, R.B., Spieler, P.J. und Goldstein, I.M.,
J. Exp. Med. 134, 149 (1971)
113. Goldstein, I., Hoffstein, S., Gallin, J. und Weissman, G.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2916 (1973)
114. Mandell, G.I.,
Infect. Immun. 9, 337 (1974)
115. Curnutte, J.T., Whitten, D.M. und Babior, B.M.,
New Engl. J. Med. 290, 593 (1974)
116. Holmes, B., Page, A.R. und Good, R.A.,
J. Clin. Invest. 46, 1422 (1967)
117. Quie, P.G., White, J.G., Holmes, B. und Good, R.A.,
J. Clin. Invest. 46, 668 (1967)
118. Reiss, M. und Roos, D.,
J. Clin. Invest. 61, 480 (1978)
119. Sagone, A.L., King, G.W. und Metz, E.N.,
J. Clin. Invest. 57, 1352 (1976)
120. Drath, D.B. und Karnovsky, M.L.,
J. Exp. Med. 141, 257 (1975)
121. Weiss, S.J., King, G.W. und LoBuglio, A.F.,
J. Clin. Invest. 60, 370 (1977)
122. Kellog, E.W. und Fridovich, I.,
J. Biol. Chem. 250, 8821 (1975)

123. Beauchamp, C. und Fridovich, I.,
J. Biol. Chem. 245, 4641 (1970)
124. McCord, J.M. und Fridovich, I.,
J. Biol. Chem. 244, 6049 (1969)
125. McCord, J.M., Keele, B.B. und Fridovich, I.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1024 (1971)
126. Gregory, E.M. und Fridovich, I.,
J. Bacteriol. 114, 1193 (1973)
127. White, J.R. und Dearman, H.H.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 887 (1965)
128. White, J.R., Vaughn, T.O. und Yeh, W.S.,
Abst. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 30, 1145 (1971)
129. Gregory, E.M., Yost, F.J. und Fridovich, I.,
J. Bacteriol. 115, 987 (1973)
130. Beauchamp, C. und Fridovich, I.,
Anal. Biochem. 44, 276 (1971)
131. Britton, L. und Fridovich, I.,
J. Bacteriol. 131, 815 (1977)
132. Valtonen, M.V., Plosila, M., Valtonen, V.V. und Mäkelä, P.H.,
Infect. Immun. 12, 828 (1975)
133. Schnaitman, C.A.,
J. Bacteriol. 104, 890 (1970)
134. Ames, G.F.-L., Spudich, E.N. und Nikaido, H.,
J. Bacteriol. 117, 406 (1974)
135. Allen, R.C., Stjernholm, R.L. und Steele, R.H.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 679 (1972)
136. Cheson, B.C., Christensen, R.L., Sperling, R., Kohler, B.E. und Babior, B.M.,
J. Clin. Invest. 58, 789 (1976)
137. Stjernholm, R.L., Allen, R.C., Steele, R.H., Waring, W.W. und Harris, J.A.,
Infect. Immun. 7, 313 (1973)
138. Stanley, D.E. und Williams, S.G.,
Anal. Biochem. 29, 381 (1969)
139. Johnston, R.B., Lehmeier, J.E. und Guthrie, L.A.,
J. Exp. Med. 143, 1551 (1976)

140. Nelson, R.D., Mills, E.L., Simmons, R.L. und Quie, P.G.,
Infect. Immun. 14, 129 (1976)
141. Beall, G.D., Repine, J.E., Hoidal, J.R. und Rasp, F.L.,
Infect. Immun. 17, 117 (1977)
142. Hatch, G.E., Gardner, D.E. und Menzel, D.B.,
J. Exp. Med. 147, 182 (1978)
143. Allen, R.C. und Loose, L.D.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 245 (1976)
144. Wick, A.N., Drury, D.R., Nakada, J.H. und Wolfe, J.B.,
J. Biol. Chem. 224, 963 (1957)
145. Wessells, N.K., Spooner, B.S., Ash, J.F., Bradley, M.O., Luduena, M.A.,
Taylor, E.L., Wrenn, J.T. und Yamada, K.M.,
Science 171, 135 (1971)
146. Stevens, P. und Young, L.S.,
Infect. Immun. 16, 796, (1977)
147. Allen, R.C.,
Infect. Immun. 15, 828 (1977)
148. Van Furth, R., Diesselhoff-Den Dulk, M.M.C. und Mattie, H.,
J. Exp. Med. 138, 1314 (1973)
149. Bianco, C., Eden, A. und Cohn, Z.A.,
J. Exp. Med. 144, 1531 (1976)
150. Werb, Z. und Gordon, S.,
J. Exp. Med. 142, 346 (1975)
151. Doe, F.W. und Henson, P.M.,
J. Exp. Med. 148, 544 (1978)
152. Kihlström, E. und Edebo, L.,
Infect. Immun. 14, 851 (1976)
153. DeChatelet, L.R., Mullikin, D., Shirley, P.S. und McCall, C.E.,
Infect. Immun. 10, 25 (1974)
154. Plant, J. und Glynn, A.A.,
Nature (London) 248, 345 (1974)
155. Collins, F.M.,
J. Bacteriol. 97, 676 (1969)
156. Moser, I.,
Dissertation Gießen (1979)
157. Collins, F.M.,
J. Bacteriol. 97, 667 (1969)

158. Collins, F.M.,
J. Bacteriol. 95, 2014 (1968)
159. Ratnam, J.S., Paul, B.B., Strauss, R.R., Jacobs, A.A. und Sbarra, A.J.,
Infect. Immun. 9, 255 (1974)
160. Page, R.C., Davies, P. und Allison, A.C.,
Lab. Invest. 30, 568 (1974)
161. Schorlemmer, H.U., Davies, P., Hylton, W., Gugig, M. und Allison, A.C.,
Br. J. Exp. Pathol. 58, 315 (1977)
162. Schorlemmer, H.U., Bitter-Suermann, D. und Allison, A.C.,
Immunology 32, 929 (1977)
163. Goldstein, I.M., Roos, D., Kaplan, H.B. und Weissmann, G.,
J. Clin. Invest. 56, 1155 (1975)
164. Goldstein, I.M. und Weissmann, G.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 604 (1977)
165. Armstrong, J.A. und Hart, P. D'Arcy,
J. Exp. Med. 134, 713 (1971)
166. Hart, P.D'Arcy, Armstrong, J.A., Brown, C.A. und Draper, P.,
Infect. Immun. 5, 803 (1972)
167. Loeb, T. und Zinder, N.D.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 282 (1961)
168. Schlecht, S. und Westphal, O.,
Zbl. Bakt., J. Abt. Orig. 200, 241 (1966)
169. Smith, J.S., Freman, G., Vogt, M. und Dulbecco, R.,
J. Virology 12, 185 (1960)
170. Yagil, E. und Rosner, A.,
J. Bacteriol. 103, 43 (1970)
171. Simon, H.B. und Sheagren, J.N.,
J. Exp. Med. 133, 1377 (1971)
172. Lowry, O.H., Rosenbough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J.,
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
173. Schnaitman, C.A.,
J. Bacteriol. 104, 882 (1970)
174. Smit, J., Kamio, Y. und Nikaido, H.,
J. Bacteriol. 124, 942 (1975)
175. Kanegasaki, S. und Wright, A.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 951 (1970)

176. Mizushima, S. und Yamada, H.,
Biochim. Biophys. Acta 375, 44 (1975)

Lebenslauf

Am 4.5.1949 wurde ich als drittes Kind des Ehepaares Wilhelm Blumenstock und Lina Blumenstock, geb. Immel, in Wallhausen (Württemberg) geboren.

Von 1955 - 1960 besuchte ich die dortige Volksschule und von 1960 - 1962 die Realschule in Crailsheim. Anschließend wechselte ich auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Crailsheim über. Dort legte ich 1969 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1969/70 immatrikulierte ich mich an der Universität Hohenheim (Stuttgart) für das Studium der Biologie. Das Sommersemester 1973 studierte ich an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg. Im Sommer 1974 bestand ich die Diplomhauptprüfung an der Universität Hohenheim. Unter der Leitung von Prof. Dr. F. Lings führte ich am Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim von September 1974 - Juni 1975 die Diplomarbeit durch über "Untersuchungen zur Regulation der Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin bei zwei Stämmen von Pseudomonas aureofaciens".

Die Arbeit zu dieser Dissertation erfolgte von September 1975 bis August 1978 unter der Leitung von Prof. Dr. K. Jann am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg.

